

Medizinische Fakultät
der
Universität-Gesamthochschule Essen

Aus der Klinik und Poliklinik für
Dermatologie und Venerologie, Allergologie

**Proliferation und Apoptose von Lymphozyten bei der HIV-Infektion:
Einfluß einer Interleukin-2 Behandlung auf die Proliferation und auf den
apoptotischen Zelltod im Blut und in Lymphknoten**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität-Gesamthochschule Essen

Vorgelegt von

Carsten Borchard

aus Münster

2001

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde
1. Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. med. U. R. Hengge
2. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. med. M. Roggendorf
3. Gutachter:	Univ. Prof. Dr. med. E. Tschachler, Universitätsklinik Wien

Tag der mündlichen Prüfung: 05. April 2001

Veröffentlichungen:

- Borchard, C., Schiffer, D., Schröder, M., Goos, M., Hengge, U.R. (2000):
Einfluß einer Interleukin-2-Therapie auf die Proliferation und Apoptose von Lymphozyten im Blut und Lymphknoten bei der HIV-Infektion.
In: Plettenberg, A., Meigel, W.N., Moll, I. (Hrsg.): Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend. Aktueller Stand von Klinik und Forschung. S. 9-12. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio: Springer
- Hengge, U.R., Borchard, C., Schröder, M., Goos, M. (2000):
Interleukin-2 und Lymphozytenumsatz bei HIV.
In: Brockmeyer, N.H., Brodt, R., Hoffmann, K., Reimann, G., Stücker, M., Altmeyer, P. (Hrsg.): HIV-Infekt. Epidemiologie, Prävention, Pathogenese, Diagnostik, Therapie, Psycho-Soziologie. S.266-269. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio: Springer
- Vortrag auf dem 7. Deutschen AIDS-Kongreß (2.-6. Juni 1999):
Hengge, U.R., Borchard, C., Schiffer, D., Schröder, M., Goos, M.:
Einfluß von Interleukin-2 auf die Proliferation und Apoptose von Lymphozyten im Blut und in Lymphknoten.
- Vortrag auf der 40. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft in Hamburg (12.-15.05.1999), Symposium: Infektiologie und Autoimmundermatosen:
Borchard, C., Schiffer, D., Schröder, M., Goos, M., Hengge, U.R.:
Einfluß von Interleukin-2 auf die Proliferation und Apoptose von Lymphozyten im Blut und in Lymphknoten.
- Borchard, C., Schiffer, D., Schröder, M., Goos, M., Hengge, U.R. (1999):
Einfluß von Interleukin-2 auf die Proliferation und Apoptose von Lymphozyten im Blut und Lymphknoten.
Hautarzt 50, Suppl. 1, 13 [Abstract 10.07.04]
- Vortrag auf den 7. Münchener AIDS-Tagen (28.01-31.01.1999), Forum Forschung:
Hengge, U.R., Borchard, C., Schiffer, D., Schröder, M., Goos, M.:
Einfluß von Interleukin-2 auf die Proliferation und Apoptose von Lymphozyten im Blut und in Lymphknoten.
- Hengge, U.R., Goos, M., Esser, S., Exner, V., Dötterer, H., Wiehler, H., Borchard, C., Müller, K., Beckmann, A., Eppner, M.T., Berger, A., Fiedler, M. (1998):
Randomised, controlled trial of subcutaneous interleukin-2 in combination with highly active antiretroviral therapy in HIV patients.
AIDS 12, 225-234.
- Vortrag (Satellitensymposium) und Poster auf der 12. Welt AIDS Konferenz in Genf (28.06.-03.07.1998):
Hengge, U.R., Exner, V., Esser, S., Borchard, C., Müller, K., Eppner, M.T., Goos, M.:
Randomized, controlled phase II trial of s.c. interleukin-2 in HIV-patients.
- Vortrag auf der „Sixth European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV-Infection“ (15.10.1997), Hamburg, Satellitensymposium: „Immunmodulation of HIV-Infection“
Hengge, U.R.: Overview of current IL-2 studies against HIV in Europe.
- Vortrag auf den 6. Münchener AIDS-Tagen (04.-06.07.1997), Satellitensymposium:
Hengge, U.R.: Erfahrungen und Trends bei der Immunmodulation von HIV-Patienten mit rIL-2.

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.:	Abbildung
ADCC:	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität („antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“)
Ag:	Antigen
AIDS:	Erworbenes Immunschwäche Syndrom („Acquired Immune Deficiency Syndrome“)
Ak:	Antikörper
APAAP:	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
APC:	Antigenpräsentierende Zelle
APO-1:	s. CD95-Rezeptor
ARC:	HIV-bezogene Allgemeinsymptome („AIDS-related complex“)
ART:	Antiretrovirale Therapie
AZT:	Azidothymidin (= Zidovudin)
BCIP:	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphatase
bDNA:	„branched-DNA“, Methode zur Bestimmung der Viruslast
BSA:	Bovines Serumalbumin
bzw.:	beziehungsweise
Ca ²⁺ :	Kalzium
Caspase:	Cysteinyl-Aspartat-spezifische Protease
CD:	„Cluster of differentiation“
CD3:	T-Zelle
CD4:	T-Helferzelle
CD8:	T-Suppressorzelle
CD20:	B-Zelle
CD23:	Aktivierte B-Zelle, follikulär-dendritische Zelle
CD56, CD57:	Natürliche Killerzelle
CD95	Transmembranöses Glykoprotein mit zytolytischer Aktivität
CDC:	„Centers for Disease Control“
ced:	„ <u>cell-death</u> gene“, apoptotische Gene der Nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> . Das ced-3-Protein ist z.B. homolog zum humanen ICE.
CMV:	Cytomegalievirus
DAB:	Diaminobenzidin
ddC:	Dideoxycytidin (= Zalcitabin)
ddI:	Dideoxyinosin (= Didanosin)
d.h.:	das heißt
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
3TC:	BCH-189 (= Lamivudin)
d4T:	Dideohydrodideoxythymidin (= Stavudin)
EDTA:	Ethylene Diamin Tetra-Acetat, Äthylendiamintetraessigsäure
Eq:	HIV-Äquivalente
Fa.:	Firma
Fas:	s. CD95
FasL:	Ligand des CD95-Rezeptors
FDC:	Follikulär-dendritische Zelle
FITC:	Fluorescein Isothiocyanat
FSC:	„Forward Scatter“
g:	Gramm oder Gravitation
gp:	Glykoprotein, z.B. gp120, HIV-Membranhüllprotein

HAART:	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HCl:	Hydrochlorid
HIV:	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA:	Humanes Leukozytenantigen
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
ICE:	Interleukin-1-β-Converting-Enzym
IE:	Internationale Einheiten
IL:	Interleukin
IGF-1:	„insulin-like growth factor-1“
kDa:	Kilodalton
Ki-67:	Nukleäres, proliferationsassoziiertes Antigen
MgCl ₂ :	Magnesiumchlorid
MHC:	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
µg:	Mikrogramm
mg:	Milligramm
min.:	Minuten
MIP:	Makrophagen Inflammatorisches Protein
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
NaCl:	Natriumchlorid
NBT:	Nitroblautetrazoliumchlorid
NK:	Natürliche Killerzelle
PE:	R-Phycoerythrin
PBL:	Periphere Blutlymphozyten
PBS:	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
p24:	Bis 1996 benutzter Surrogatmarker, Eiweißmolekül der HIV-Kernhülle
p53:	Onkosuppressorprotein
r:	Korrelationskoeffizient
RNA:	Ribonukleinsäure
RT:	Reverse Transkriptase
RTI:	Reverse-Transkriptase-Inhibitor
s.c.:	subkutan
sec.:	Sekunden
SSC:	„Side Scatter“
Tab.:	Tabelle
Tar:	„transactivation response element“, HIV Genprodukt
Tat:	„transcriptional activator protein“, HIV-Regulatorgen
TBS:	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCR:	Antigen-spezifischer T-Zell-Rezeptor
TdT:	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
T _H :	T-Helferzelle
TNF:	Tumor-Nekrose-Faktor
TRS:	Target-Retrieval-Solution, Pufferlösung
TUNEL:	Terminale Desoxynucleotidyltransferase-vermitteltes dUTP-Biotin Nick Endlabeling
WHO:	„World Health Organisation“
z.B.:	zum Beispiel
ZNS:	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Einführung	1
1.2. Fragestellung	4
2. Literaturübersicht	6
2.1. Apoptose	6
2.1.1. Funktion und Morphologie der Apoptose	6
2.1.2. Der Mechanismus der Apoptose	9
2.1.3. Die Apoptose bei der HIV-Infektion	11
2.1.4. Einfluß von Interleukin-2 und einer antiretroviralen Therapie auf die Apoptose	16
2.2. Zellaktivierung und Zellproliferation	17
2.2.1. Einfluß einer antiretroviralen Therapie auf die T-Zell-Dynamik	17
2.3. Interleukin-2	22
2.3.1. Immunmodulation durch Interleukin-2 bei der HIV Infektion	22
2.3.2. Interleukin-2-Rezeptoren	25
3. Material und Methoden	28
3.1. Durchflußzytometrische Bestimmung der Apoptose in Blutlymphozyten	28
3.1.1. Prinzip der Annexin-Methode	28
3.1.2. Verwendete Reagenzien	29
3.1.3. Technische Ausrüstung	29
3.1.4. Verwendetes Material	29
3.1.5. Arbeitsschritte	29
3.2. Lichtmikroskopische Bestimmung der Apoptose in Lymphknoten	32
3.2.1. Prinzip der TUNEL-Methode	32
3.2.2. Verwendete Reagenzien	33
3.2.3. Technische Ausrüstung	33
3.2.4. Verwendetes Material	33
3.2.5. Arbeitsschritte	34
3.3. Lichtmikroskopische Bestimmung der Apoptose von Lymphozytensubpopulationen in Lymphknoten	37
3.3.1. Prinzip der Doppelfärbung mit TUNEL und APAAP	37
3.3.2. Prinzip der APAAP-Methode	37
3.3.3. Verwendete Reagenzien	38
3.3.4. Technische Ausrüstung	40
3.3.5. Verwendetes Material	40
3.3.6. Arbeitsschritte	40
3.4. Durchflußzytometrische Bestimmung der Proliferation in Blutlymphozyten	42
3.4.1. Prinzip der MIB-1-Reaktion	42
3.4.2. Verwendete Reagenzien	42
3.4.3. Technische Ausrüstung	43
3.4.4. Verwendetes Material	43
3.4.5. Arbeitsschritte	43

3.5. Lichtmikroskopische Bestimmung der Proliferation von Lymphozytensubpopulationen in Lymphknoten	46
3.5.1. Prinzip der APAAP-Methode und der MIB-1-Reaktion	46
3.5.2. Verwendete Reagenzien	47
3.5.3. Technische Ausrüstung	50
3.5.4. Verwendetes Material	50
3.5.5. Arbeitsschritte	50
3.6. Statistische Berechnung	52
3.6.1. Berechnung des Korrelationskoeffizienten	52
3.6.2. Berechnung des arithmetischen Mittelwertes	52
3.6.3. Berechnung der Standardabweichung	52
4. Ergebnisse	53
4.1. Patientencharakteristika	53
4.1.1. Apoptose von Lymphozyten im peripheren Blut bei HIV-Patienten	53
4.1.2. Einfluß von IL-2 auf Apoptose und Proliferation von Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut bei HIV-Patienten	55
4.1.3. Apoptose in Lymphknoten bei HIV-Patienten	60
4.1.4. Einfluß von IL-2 auf Apoptose und Proliferation von Lymphozyten in Lymphknoten bei HIV-Patienten	62
4.2. Apoptose	65
4.2.1. Apoptose in peripheren Blutlymphozyten bei Patienten ohne IL-2 Therapie	65
4.2.2. Apoptose in peripheren Blutlymphozyten bei Patienten unter IL-2 Therapie	69
4.2.3. Apoptose in Lymphknoten bei Patienten ohne IL-2 Therapie	74
4.2.4. Apoptose in Lymphknoten bei Patienten unter IL-2 Therapie	79
4.3. Proliferation	87
4.3.1. Proliferation in peripheren Blutlymphozyten bei Patienten unter IL-2 Therapie	87
4.3.2. Proliferation in Lymphknoten bei HIV-Patienten unter IL-2 Therapie	92
4.4. Viruslast	104
4.4.1. Viruslast in Lymphknoten bei Patienten ohne IL-2 Therapie	104
4.4.2. Viruslast in Lymphknoten bei HIV-Patienten unter IL-2 Therapie	107
5. Diskussion	108
5.1. Diskussion der Methode	108
5.2. Apoptose von Blutlymphozyten HIV-positiver Patienten	110
5.3. Apoptose in Lymphknoten HIV-positiver Patienten	111
5.4. Proliferation und Apoptose in Blutlymphozyten und in Lymphknoten HIV-positiver Patienten unter IL-2 Therapie	114
5.5. Viruslast in Lymphknoten HIV-positiver Patienten unter IL-2 Therapie	120
6. Schlußfolgerungen	122
7. Zusammenfassung	123
8. Literaturverzeichnis	124
9. Anhang	142
9.1. Lebenslauf	142
9.2. Danksagung	143

1. Einleitung

1.1. Einführung

Die bisherige Therapie der HIV-Infektion basierte auf der Mono- oder Kombinationstherapie eines oder mehrerer Nukleosidanaloga, wie z.B. Zidovudin (AZT), Didanosin (ddI), Zalcitabin (ddC), Lamivudin (3TC) und Stavudin (d4T). Besonders unter der Monotherapie kam es allerdings recht schnell zur Selektion resistenter Virusstämme, so daß die Progression des Krankheitsverlaufes nur wenig beeinflußt wurde. Nach Einführung der neuen Medikamentenklasse der Proteinaseinhibitoren (Saquinavir, Ritonavir, Indinavir und Nelfinavir) 1996 ergab sich eine neue Möglichkeit, das HI-Virus effektiver zu bekämpfen. Durch die Dreierkombination eines Proteinaseinhibitors mit zwei Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (RTI), als sogenannte hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART), läßt sich die HI-Virämie vielfach unter die Nachweisgrenze der heute gebräuchlichen Tests zur Bestimmung der HI-Viruslast senken und die CD4-Helfer-Zellzahl wieder anheben [44]. Diese Therapien können den Verlauf der HIV-Infektion günstig beeinflussen, indem sie die Inzidenz der opportunistischen Infektionen senken und eine (partielle) Regeneration des Immunsystems bewirken [9]. Jedoch besitzen sie eine zeitlich begrenzte Wirkung und können den Verfall des Immunsystems im Verlaufe der HIV-Infektion nicht verhindern.

Eine zusätzliche therapeutische Methode zur Prävention und Verzögerung des fortschreitenden Immundefektes bzw. zur Wiederherstellung der Immunkompetenz besteht in der Verbesserung der zellvermittelten Immunität. Interleukin-2 (IL-2) ist ein lösliches Glykoprotein, das eine zentrale Rolle in der Regulation der T-Zell-vermittelten Immunantwort spielt. IL-2 wird von T-Lymphozyten nach Aktivierung durch ein Antigen oder ein unspezifisches Mitogen produziert und ist fähig, die Proliferation von Lymphzellen zu induzieren [130]. IL-2 stimuliert das Wachstum von aktivierten T-Zellen sowie von natürlichen Killerzellen [139]. Ebenso wird die Proliferation der CD4-Helfer- und CD8-Suppressorzellen angeregt und die zytotoxische Aktivität gegenüber verschiedenen Zielzellen erhöht [75]. Schon in einem frühen Stadium der HIV-Infektion wird IL-2 vermindert gebildet [62]. In der 1996 begonnenen Interleukin-2 Studie in der Universitätsklinik Essen wurde

die Wirkung einer begleitenden Therapie mit dem Immunmodulator Interleukin-2 zusätzlich zur hochaktiven antiretroviralen Therapie mit Nukleosidanaloga (AZT, 3TC) und einem Proteinaseinhibitor (Saquinavir) untersucht. Da die Toxizität der IL-2 Therapie bei intravenöser Applikation hoch und die Verweildauer im Körper (Halbwertszeit: 13-18 min) kurz ist, wurde bei der vorliegenden Studie die vorteilhafte subkutane Applikation gewählt. In Pilotstudien hat sich gezeigt, daß subkutan [28, 57, 80] verabreichtes IL-2 ähnliche Effekte wie bei intravenöser Gabe [65, 66] hervorruft. Die Resorption in das Blut ist jedoch verzögert (verlängerte Verweildauer im Körper) und die Toxizität ist um ein Vielfaches geringer. In den beiden Studien von Kovacs et al. [65, 66] zeigte sich, daß eine intravenöse Behandlung mit 6-12 Mio. IE IL-2 pro Tag an 5 aufeinanderfolgenden Tagen alle 8 Wochen zu einer steigenden und stabilen CD4-Zellzahl führte. Neuere Studien zeigen, daß das Reservoir latent infizierter CD4-Zellen durch IL-2 Gabe reduziert werden kann [20].

Der große Nachteil der intravenösen Behandlung lag in der hohen Toxizität des IL-2 und der damit verbundenen Hospitalisation der Patienten während der Behandlung. Als limitierende Nebenwirkungen traten zum einen das sogenannte „capillary-leak“-Syndrom, eine Sonderform des Angioödems, mit generalisierten Ödemen, Aszites, Kreislaufschock und Veränderungen der Nieren- und Leberfunktion auf. Zum anderen traten weitere Symptome wie Myalgien, Fieber, Müdigkeit und gastrointestinale Störungen auf.

Die einjährige, unter randomisierten und kontrollierten Bedingungen durchgeführte Studie [51] sollte die immunologischen und virologischen Auswirkungen einer Intervalltherapie mit subkutan verabreichtem IL-2 (9 Mio. IE für 5 Tage) an 44 HIV-Patienten in unterschiedlichen Stadien der Infektion (CD4-Zellzahl zwischen 200-500/ μ l) unter einer stabilen antiretroviralen Dreiertherapie (AZT, 3TC, Saquinavir) untersuchen. Die 44 Patienten wurden in zwei Gruppen (A und B) eingeteilt, um neben der Verträglichkeit und Sicherheit der IL-2 Therapie auch das optimale Zeitintervall der zu verabreichenden Injektionen zu ermitteln. Die Gruppe A erhielt in einem starren Zeitintervall alle 6 Wochen einen fünftägigen Zyklus von IL-2. Die Patienten der Gruppe B erhielten IL-2 in einem Intervall, welches von dem erreichten Effekt der Interleukin-2 Therapie abhängig war. Dieses Intervall definierte sich dadurch, daß der Zyklus immer dann begonnen wurde, wenn die CD4-Zellen nach

dem initialen Anstieg das 1,25-fache des Ausgangswertes zu Studienbeginn unterschritten (z.B. Ausgangswert von 400 CD4-Zellen/ μ l, Beginn eines neuen Zyklus bei Unterschreiten von 500 CD4-Zellen/ μ l). Die beiden Gruppen der 44 IL-2 erhaltenden Patienten wurden mit einer Kontrollgruppe von 20 Patienten verglichen, die die gleiche antiretrovirale Therapie, aber kein IL-2 erhielten.

21 Patienten der Gruppe A und 19 Patienten der Gruppe B sowie 18 Patienten der Kontrollgruppe beendeten im August 1997 die Studie. In der Gruppe A wurden pro Patient durchschnittlich 8,5 Zyklen und in der Gruppe B pro Patient durchschnittlich nur 4,6 Zyklen verabreicht. Die IL-2 Behandlung war in beiden Gruppen sehr gut verträglich. Neben Temperaturerhöhung und grippalen Symptomen kam es bei etwa der Hälfte der Patienten zu verhärteten, lymphzellreichen Hautarealen im Bereich der Injektionsstellen. Schwerere Nebenwirkungen (Anstieg der Leberfunktionsparameter bei einem Patienten; mögliche Reaktivierung einer Depression bei zwei Patienten) waren selten.

Die Auswertung der Studie zeigte einen deutlichen Effekt des IL-2 auf das Immunsystem. Die CD4-Zellen stiegen unter der Gabe von IL-2 durchschnittlich um mehr als 100 Zellen/ μ l Blut an. In der Gruppe A fand sich im Median ein Anstieg von 370 Zellen/ μ l auf 492 Zellen/ μ l und in der Gruppe B ein Anstieg von 350 auf 468 Zellen/ μ l. Die Kontrollgruppe zeigte nur einen geringen Anstieg der CD4-Zellen von 388 auf 415 Zellen/ μ l. Bei den IL-2 Patienten fand sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg der für das Immunsystem wichtigen natürlichen Killerzellen. Zur Dokumentation der positiven Wirkung des IL-2 auf das Immunsystem und der Infektabwehr wurden alle Infektionen und Haut- bzw. Schleimhautveränderungen registriert. Bei keinem der IL-2 erhaltenden Patienten wurde eine das Vollbild AIDS charakterisierende Infektion diagnostiziert, während bei 3 Patienten der Kontrollgruppe ein Kaposi-Sarkom aufgetreten ist. Auch zeigten sich in der Kontrollgruppe 3 bis 6 mal so viele Infektionen, wie z.B. Mundsoor, Condylomata acuminata, Herpes zoster und Herpes simplex, die als Markererkrankungen eines schwächer werdenden Immunsystems gelten [143].

Auch bei HIV-Patienten, die gleichzeitig an einer Hepatitis B oder C leiden, konnte IL-2 sicher angewendet werden; die mittlere Virusmenge an Hepatitispartikeln stieg nicht an. Untersucht wurde auch die Entwicklung der HI-Viruslast im Blutplasma und in den Lymphknoten unter IL-2 Therapie, da durch die stimulierende Wirkung des

IL-2 auf die Lymphozyten eine erhöhte Produktion an Viren möglich erscheint. Weder in Lymphknoten, entnommen von 5 Patienten vor Beginn der IL-2 Therapie und nach 6 Monaten, noch im Blutplasma fand sich eine Vermehrung der Virusmenge.

Nach bisherigen Erkenntnissen auch anderer Gruppen [1, 72] scheint IL-2 in Verbindung mit einer wirksamen antiretroviralen Therapie eine zusätzliche und sichere Methode zur immunmodulatorischen Behandlung der HIV-Infektion zu sein. Die individuelle Therapiesteuerung bei der Gruppe B führte zu den gleichen erwünschten Effekten mit dem Vorteil einer Verminderung der notwendigen IL-2 Gaben und der damit verbundenen Nebenwirkungen [51].

1.2. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage der Proliferation und des programmierten Zelltodes (Apoptose) der T-Lymphozyten unter IL-2 Gabe. Es soll geklärt werden, ob die nachgewiesene Zellvermehrung unter IL-2 durch eine erhöhte Zellteilung zustande kommt oder auf einer erhöhten Ausschwemmung, also Umverteilung der Lymphzellen aus den lymphatischen Organen, beruht. Eine hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) alleine bewirkt offensichtlich keine Zellteilung der T-Lymphozyten im peripheren Blut [141]. Des weiteren soll geklärt werden, ob IL-2 trotz der Verbesserung der Funktion des Immunsystems mit dem Anstieg der CD4-Zellen einen proapoptotischen Effekt besitzt [39, 70] oder ob die Gabe von IL-2, wie von *in vitro* Versuchen bekannt, einen antiapoptotischen Einfluß aufweist [2, 26].

Als Material standen Lymphknoten von 5 Patienten der Interleukin-2 Studie, jeweils vor und 6 Monate nach Beginn der Therapie (von einem Patienten noch zusätzlich 24 Monate nach Beginn der IL-2 Therapie) sowie peripheres Venenblut von 11 bzw. 13 Patienten im Verlauf eines IL-2 Zyklus zur Verfügung. Weiterhin wurden Lymphknoten von 25 HIV-Patienten (darin enthalten die 5 IL-2 Patienten vor Einschluß in die Studie) und Venenblut von 29 HIV-Patienten, die keine IL-2 Therapie erhielten, abhängig vom Stadium der HIV-Erkrankung untersucht.

Die Bestimmung der Proliferation wurde sowohl durchflußzytometrisch im peripheren Blut, als auch lichtmikroskopisch in den Lymphknoten mit Hilfe des Proliferationsmarkers MIB-1 auf verschiedenen Lymphozytensubpopulationen durchgeführt [17, 61, 121].

Die Untersuchung der Apoptose wurde im peripheren Blut durchflußzytometrisch durch Bestimmung des Oberflächenproteins Annexin, einem Frühmarker der Apoptose [144], und in den Lymphknoten lichtmikroskopisch mit Hilfe der TUNEL-Methode [109, 122, 150] jeweils auf verschiedenen Lymphozytensubpopulationen durchgeführt.

2. Literaturübersicht

2.1. Apoptose

2.1.1. Funktion und Morphologie der Apoptose

Zellwachstum und -vermehrung, Zelldifferenzierung und Zelltod eukaryontischer Organismen unterliegen einer strengen Regulation, die die Aufrechterhaltung des normalen Gleichgewichts zwischen Neuproduktion und Verlust von Zellen gewährleistet. Der Begriff der Apoptose taucht zum ersten Mal 1972 in der biochemischen Literatur auf [60]. Der Begriff ist aus dem griechischen *apo* (ab, weg, los) und *ptosis* (Senkung) abgeleitet und bezeichnet das Abfallen wie welke Blätter. Dies soll den Unterschied zur Nekrose (*necrosis* = Absterben, Tod) verdeutlichen. Kerr, Wyllie und Currie beschreiben einen Prozeß mit bestimmten morphologischen Veränderungen bei T-Lymphozyten, der durch die Einwirkung von Glukokortikoiden zum Tod der Zelle führt. Diese Art von Zelltod, die sich grundlegend von dem bekannten Prozeß der Nekrose unterscheidet, nannten sie Apoptose [60]. Das Absterben von Zellen an sich war nie zweifelhaft, und daß der Zelltod in einigen Fällen ein Teil eines überschießenden Entwicklungsprogrammes sein kann, ist zumindest seit der deskriptiven Arbeit von Glücksmann 1951 bekannt [40]. Dieses Erkenntnis wurde durch die experimentelle Arbeit von Saunders untermauert [118]. Der einzigartige Charakter dieses regulierten physiologischen Absterbens der Zellen wurde von Lockshin und Williams 1964 unter dem Begriff „programmierter Zelltod“ zusammengefaßt [76]. Die Apoptose ist eine morphologisch distinkte und genetisch regulierte Form des Zelltodes, die über eine Kaskade von katabolischen Reaktionen zu einer Art Selbstmord der Zelle führt. Im Gegensatz zur Nekrose, die infolge einer starken Verletzung der Zelle auftritt, wird die Apoptose durch extrazelluläre Signale ausgelöst, wie z.B. den Verlust essentieller Wachstumsfaktoren, Aktivierung bestimmter Zelloberflächenrezeptoren, Einwirken von Glukokortikoidhormonen oder DNA-schädigenden Agenzien [155]. Diese Signale initiieren das intrazelluläre „Zelltod“-Programm, welches eine *de novo* Genexpression erfordert. Morphologische und biochemische Analysen apoptotischer Zellen lassen charakteristische Merkmale erkennen: Die apoptotische Zelle schrumpft und löst sich von ihren Nachbarzellen ab, die Membranasymmetrie der vitalen Zellen geht verloren, Phosphatidylserin, ein

negativ geladenes Phospholipid der Zellmembran, welches normalerweise asymmetrisch in das Zytosol hereinreicht, gelangt an die Zelloberfläche. Apoptotische Lymphozyten können so von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden [34]. Es kommt zur Kondensation des Zytoplasmas und Verlust der Plasmamembran-Mikrovilli. Die Zellorganellen behalten ihre Struktur bei, im Gegensatz zum Zellkern, der sein Erscheinungsbild stark verändert. Hier kommt es zur Segmentierung und zum Abbau chromosomaler DNA [60, 155]. Nach elektrophoretischer Auftrennung stellt sich die fragmentierte DNA als DNA-Leiter im Agarosegel dar [154]. Die Zellen zerfallen schließlich in apoptotische Körperchen, die durch Phagozytose ohne das Auftreten einer Entzündungsreaktion eliminiert werden [60].

Bei der Nekrose hingegen, der pathologischen Form des Zelltodes, geht Gewebe durch eine mechanische Verletzung oder durch andere irreparable Schäden, z.B. durch Hypoxie zugrunde. Mikroskopisch sind auch hier typische morphologische Veränderungen zu erkennen, die sich von denen der Apoptose unterscheiden. Es tritt eine Zellschwellung und -lyse auf, da die Zelle und die Zellorganellen (vor allem die Mitochondrien) aufblähen und zerplatzen [142]. Die Ursache liegt in einem Verlust der Zellintegrität; bedingt durch die Schädigung ist die Zelle nicht mehr fähig, ihren Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt zu kontrollieren. Natrium- und Kaliumionen dringen ein und bringen durch den begleitenden Wassereinstrom die Zelle zum Platzen. Charakteristisch ist die begleitende Entzündungsreaktion, bei der einwandernde Makrophagen die geschädigten Zellen phagozytieren. Dadurch wird der Infektionsherd begrenzt, jedoch können durch die von den Immunzellen abgegebenen Stoffe auch benachbarte Zellen geschädigt werden [155]. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Fragmente der nekrotischen Zellen erscheint das Chromatin im Gel als Schmierspür, was auf einen unregelmäßigen Zellzerfall hindeutet [154].

Der programmierte Zelltod spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des normalen Zellumsatzes. Für eine normale Entwicklung und eine regelrechte Funktion des Körpers ist es notwendig, daß sich Zellen in gesetzmäßiger Weise teilen und vermehren und die Fähigkeit besitzen, sich regelrecht selbst zu eliminieren. Die Apoptose sorgt dafür, daß Zellen, die ihre Aufgabe erfüllt haben oder von der Norm abweichen, sich selbst zerstören. Der programmierte Zelltod ist ein Prozeß, auf den

nicht nur der sich entwickelnde Organismus angewiesen ist, sondern der auch für den vollentwickelten Organismus unabdingbar ist und ihn lebenslang begleitet. Während der Embryogenese, Metamorphose und endokrin-abhängigen Gewebeatrophie sterben die Zellen durch Apoptose. Den Anstoß gibt der Entzug von Wachstums- oder Überlebensfaktoren, mit denen sich benachbarte Zellen verständigen oder der Entzug von Hormonen bei hormonabhängigen oder -sensitiven Zellen. Aber auch milde thermische oder metabolische Stressoren sowie falsche bzw. widersprüchliche Kommandos im Bezug auf die Zellteilung können den programmierten Zelltod auslösen. Von entscheidender Bedeutung ist der apoptotische Zelltod zudem für die Integrität des Immunsystems bei der negativen Selektion von T-Zellen im Thymus, bei der klonalen Deletion von B-Zellen oder bei der Abtötung von Zellen, die als Zielzellen von T- und natürlichen Killerzellen dienen. Weiterhin bedeutsam ist die Apoptose für die Regulation der Immunantwort. T-Lymphozyten, deren Aufgabe nach einer abgelaufenen Infektion des Körpers beendet ist, müssen rechtzeitig eliminiert werden, da sonst die Gefahr bestünde, daß sie überhand nehmen und chronische Entzündungen verursachen oder sich durch eine Überaktivierung gegen körpereigenes Gewebe richten. Auch die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und die Zytokin-vermittelte Zytotoxizität werden durch apoptotische Vorgänge beeinflusst [41, 135, 140]. In vielen Studien konnte weiterhin gezeigt werden, daß Tumorregression durch Apoptose vermittelt wird [140, 155]. Jedoch ist die Fehlregulation des programmierten Zelltodes auch maßgeblich an der Entwicklung und Progression maligner Tumoren beteiligt. Die Inhibition der Apoptose in Tumorzellen beeinflusst daher nicht nur die physiologische Kontrolle der Zellzahl durch Verlängerung der zellulären Lebensdauer. Vielmehr konnte gezeigt werden, daß auch Resistenzen gegen physiologische Abwehrmechanismen und Tumorthérapien mit Zytostatika oder Bestrahlungen ausgelöst werden [140]. Die Untersuchung des programmierten Zelltodes gewinnt zunehmend an Interesse in Forschung und Routinediagnostik. Über dreißig neue Moleküle wurden entdeckt, deren Aufgabe die Initiation und Regulation der Apoptose ist. Weitere zwanzig Moleküle wurden als verantwortlich für die DNA-Replikation, Transkription oder DNA-Reparatur bei der Apoptose erkannt. Viele Fragen beschäftigen sich derzeit mit der Kontrolle biologischer Proliferations-, Differenzierungs- und Zelltodprozesse, um so einen

Beitrag zur Klärung neoplastischer Zellentartung, Autoimmunerkrankungen oder der HIV-Infektion zu leisten.

2.1.2. Der Mechanismus der Apoptose

Die Apoptose ist eine aktive, genetisch regulierte Form des Zelltodes. Signale, die das „Zelltod“-Programm initiieren, vermitteln ihre Effekte über verschiedene Signaltransduktionswege, wobei Apoptose-assoziierte Gene entweder *de novo* exprimiert werden oder die Modulation entsprechender Genprodukte den apoptotischen Prozeß beeinflußt [100].

Die Schädigung und Spaltung der DNA-Doppelstränge z.B. durch UV-Licht, alkylierende Substanzen oder ionisierende Strahlung setzt ein potentes Apoptoseprogramm in Kraft, welches auf der Aktivierung des nukleären Phosphoproteins p53, ein Onkosuppressorprotein, durch die Zelle basiert [12].

Ein anderes Gen, dessen Transkription den Zelltod initiieren kann, ist das Gen c-myc [33]. Die Aktivierung von c-myc bewegt die Zelle zum Eintritt in die DNA-Synthese und ist für einen gleichmäßigen und ununterbrochenen Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus erforderlich. Die Aktivierung von c-myc bei gleichzeitiger Abwesenheit von unterstützenden Zytokinen triggert die Apoptose. Dies kann als regulatorischer Schwelleneffekt interpretiert werden: Die Expression von c-myc steigert das Bedürfnis der Zelle nach Überlebensfaktoren wie z.B. IGF-1 [33].

Molekulargenetische Untersuchungen des programmierten Zelltodes an der Nematode *Caenorhabditis elegans* führten zu der Entdeckung einer Reihe von Proteinen, die homolog in anderen Spezies vorkommen und verantwortlich für das An- oder Abschalten der Apoptose sind [48, 156]. Diese Proteine sind Produkte der Gene ced-3 und ced-4, welche den programmierten Zelltod initiieren und das Gen ced-9, welches die Apoptose verhindert. Weitere 7 Gene sind für die Erkennung und Phagozytose der zum Zelltod verurteilten Zellen verantwortlich. Ced-3 ist der Prototyp einer Familie von rund einem Dutzend Proteasen in Säugetierzellen, die auch Caspasen (Cysteiny-Aspartat-spezifische Proteasen) genannt werden [156]. Das Produkt des ced-3, die Caspase-1 oder ICE-artige Protease (Interleukin-1- β -Converting-Enzym) ist eine der am besten untersuchten Caspasen. Die aktive Form des Interleukin-Converting Enzyms aktiviert das proinflammatorische Lymphokin IL-1 β und inaktiviert indirekt das Enzym Poly-Ribose-Polymerase, welches zur DNA Reparatur benötigt wird. Die

Zelle ist nicht mehr in der Lage, die angerichteten Schäden im Zellzyklus zu beheben und geht zugrunde [128, 155].

Caspasen liegen in den meisten, aber nicht in allen Zellen in inaktiver, proenzymatischer Form vor und können durch Spaltung aktiviert werden. Eine der Tötungsmechanismen der zytotoxischen T-Zellen wird durch die Protease Granzym B vermittelt, welche in die Zielzelle eindringt und die latenten Proenzyme triggert. Ein weiterer Trigger ist das *C. elegans* ced-4 Protein, welches das Apoptoseprogramm auslöst, wenn der Energiemetabolismus einer Zelle zusammenbricht oder die Mitochondrien der Zelle z.B. durch Kalzium geschädigt werden [135].

Die spezifische Empfindlichkeit der Zellen, auf entsprechende Reize mit dem programmierten Zelltod zu reagieren, unterliegt wahrscheinlich dem modulierenden Einfluß einer Familie miteinander konkurrierender Proteine: Bcl-2 und seinen Verwandten Bcl-x, Bax, Bad, Bak und einigen anderen [3]. Das Bcl-2 Protein, ein Homolog des ced-9 Proteins ist ein intrazelluläres 26 kDa Protein, welches in den Membranen des Kerns, des endoplasmatischen Retikulums sowie der Mitochondrien lokalisiert ist. Bcl-2 supprimiert die Induktion des apoptotischen Zelltodes, der durch unterschiedliche Signale und Effektoren vermittelt wird, wie z.B. alkylierende Substanzen, UV-Strahlung, p53, c-myc, TNF, Ca^{2+} oder Entzug wichtiger Überlebensfaktoren der Zelle (z.B. Interleukin-2). Die Unterdrückung des programmierten Zelltodes führt zu einer Akkumulation von überalterten Zellen, aber nicht zu einer verstärkten Proliferation. Die aus dem Bcl-x Gen entstehenden Proteine Bcl-x_L und Bcl-x_S unterscheiden sich in ihrer Aktivität. Wie Bcl-2 supprimiert auch Bcl-x_L den apoptotischen Zelltod. Demgegenüber unterstützt Bcl-x_S die Induktion der Apoptose durch Inhibition der Suppressor-Aktivität des Bcl-2 Proteins. Weitere Antagonisten von Bcl-2 sind die zellulären Proteine Bax, Bad, Bak. Das Verhältnis aller Mitglieder der Bcl-2 Familie zueinander entscheidet mit darüber, wie leicht sich das Apoptoseprogramm einleiten läßt. Außerdem scheinen diese Bcl-2 Proteine die Signale von der Zelloberfläche und die Aktivierung der ICE-Proteasen zu kontrollieren [3, 14, 46, 90, 97].

Ein weiterer Mechanismus basiert auf der Aktion eines Moleküls namens Fas (APO-1, CD95). Das Fas-Antigen ist ein transmembranöses Rezeptorprotein, welches zur Familie der TNF/NGF-Rezeptor Familie gezählt wird. Der Fas-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der durch Apoptose regulierten T-Zellentwicklung. T-

Lymphozyten, deren Aufgabe im Immunsystem erfüllt ist, müssen inaktiviert werden. Dieses kann durch Entzug wichtiger Überlebensfaktoren, wie zum Beispiel Interleukin-2 oder durch die Aktivierung des Fas-Ligandensystems erfolgen. Ruhende Zellen produzieren den Fas-Rezeptor (CD95-Rezeptor) nur in geringen Mengen. Werden sie durch ein Antigen aktiviert, wird die Produktion von vielen zusätzlichen, allerdings noch funktionsuntüchtigen, Fas-Molekülen angeregt. Neben dem Fas-Rezeptor produzieren die T-Zellen ein weiteres Oberflächenmolekül, den Fas-Liganden. Wenige Tage nach Ablauf einer Infektion werden die noch funktionsuntüchtigen Fas-Rezeptoren aktiv. Durch Andocken von Fas-Liganden oder Antikörpern an den aktiven Fas-Rezeptor wird in vielen lymphoiden oder nicht-lymphoiden Zellen ein apoptotisches Signal ausgelöst [11, 29, 32, 59, 78, 82, 87, 127].

2.1.3. Die Apoptose bei der HIV-Infektion

In einem normal funktionierenden Immunsystem werden die T-Helferzellen (CD4) bei einer Infektion aktiviert, indem antigenpräsentierende Zellen (APC), z.B. Makrophagen, den Krankheitserreger (z.B. ein Virus) aufnehmen und zerlegen. Die Bruchstücke des Erregers, die sogenannten „prozessierten Antigene“, werden zusammen mit den MHC-Klasse-II Molekülen an der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle (APC) präsentiert. Die ruhende CD4-Zelle, die mit ihrem Rezeptor das Antigen erkennt, lagert sich an den Komplex an und wird aktiviert. Die CD4-Zellen nehmen nun eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Immunantwort ein. Sie helfen B-Zellen bei der Antikörperbildung und modulieren andere Effektorzellen, z.B. zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen, Makrophagen, Granulozyten und antikörperabhängige zytotoxische Zellen. Viele dieser Effekte werden über Lymphokine vermittelt, aber auch Zytokine aus anderen Zellen (vor allem Makrophagen) spielen eine wichtige Rolle. Die T- und B-Zellen selbst werden ihrerseits durch die T-Suppressorzellen (CD8) beeinflusst. Die aktivierten T-Zellen vermehren sich und zeigen den unreifen Fas-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Nach einigen Tagen wird der Fas-Rezeptor funktionsfähig und bindet den Fas-Liganden. Dies bedeutet die Induktion der Apoptose in der den Fas-Rezeptor tragenden Zelle [5, 6, 78, 90].

Das Immunschwächesyndrom AIDS beinhaltet eine Fehlsteuerung im Sinne einer übermäßigen Apoptose von Immunzellen. Das HI-Virus befällt vorwiegend Zellen, die

das CD4 Oberflächenantigen tragen: T-Helferzellen, Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen (z.B. Langerhans' Zellen der Epidermis). Daneben sind Korezeptoren für das Eindringen von HIV-1 in die Zielzellen unerlässlich. Die beta-Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR3 haben für Makrophagen-trope HI-Viren Korezeptorfunktion. Der alpha-Chemokinrezeptor CXCR4 hat für T-Lymphozyten-trope HI-Viren Korezeptorfunktion [84]. Neben den genannten sind noch sieben weitere Korezeptoren bekannt, die von dem HI-Virus benutzt werden (CCR2b, STRL33, GPR15, GPR1, V28, CCR8 und US28) [31]. Aufgrund des Tropismus des HI-Virus zu CD4 tragenden Zellen, werden vor allem die T-Helferzellen befallen und gehen zugrunde. Durch Zerstörung der CD4-Zellen sinkt deren absolute Zahl unter die Normgrenze von 500/ μ l; hierdurch erniedrigt sich der Quotient CD4-/CD8-Zellen (Norm: größer 2). Die Folge dieser massiven Schädigung sind die bekannten opportunistischen Infektionen im Vollbild AIDS. In der Folge schwinden ebenfalls die CD8-Zellen, da sie ihren apoptotischen Zerfall nur verhindern können, solange sie Wachstumssignale von den CD4-Zellen erhalten. Ebenfalls gehen hämatopoetische Vorläuferzellen des Knochenmarks und Neurone des Nervensystems zugrunde. Der Tropismus des HI-Virus für CD4 tragende Zellen und sein zytopathischer Effekt auf diese Zellen *in vitro* führte zu der Vermutung, daß AIDS allein aufgrund der virusvermittelten Zellzerstörung durch das HI-Virus selbst entsteht [6]. Dieses Konzept wurde aber aufgrund einiger Beobachtungen verworfen: Zum einen wird eine starke Beeinträchtigung der CD4-Zellfunktion im peripheren Blut beobachtet, obwohl nur 0,1% dieser CD4-Zellen infiziert sind [5, 94]. Ebenso sind vor allem die nicht infizierten CD4-Zellen in Lymphknoten HIV-positiver Patienten vom apoptotischen Zerfall betroffen und nicht die infizierten Zellen [35, 36]. Dies deutet daraufhin, daß das HI-Virus auch nicht infizierte CD4-Zellen beeinflussen kann. Zum anderen wird ein Verlust an Neuronen im Nervensystem mit Hirnatrophie und Demenz beobachtet, obwohl Neurone nicht das Ziel für einen direkten Virusbefall sind [6]. Das HI-Virus muß also Mechanismen besitzen, nicht infizierte Zellen zu schädigen. Verschiedene Mechanismen der Apoptose bei AIDS sind bekannt und werden im folgenden beschrieben:

Der virologische Ansatz geht von einem direkten zytopathischen Effekt des HIV-1 aus, der zur Lyse von einzelnen Zellen beiträgt. Nach der Infektion der Zelle kommt es

im späteren Verlauf zu Verschiebungen in der Lipidzusammensetzung der T-Zellmembranen, was eine erhöhte Membranpermeabilität verursacht [23]. Die massive virale Vermehrung in der Zelle führt ebenfalls über eine Verletzung der Zellmembran zum Zelltod [136]. Weiterhin sind die toxischen Effekte der Virushüllenproteine in den Zielzellen des HI-Virus zu nennen [63, 132]. Neben der Lyse von einzelnen Zellen kann es auch zur Bildung eines sogenannten Synzytiumverbandes kommen. Der Tropismus des HIV-1 für CD4-tragende Lymphozyten führt zu einer Anbindung des viralen Hüllproteins gp120 an den Virusrezeptor, das CD4-Molekül. Die Rezeptoranbindung führt zu einer Fusion der viralen Hülle und der Zielzellmembran und ermöglicht somit das Eindringen des Virus. Bei einem ähnlichen Prozeß wird das HIV Hüllprotein gp120 auf der Zelloberfläche von infizierten T-Zellen präsentiert, welches zu einer Fusion von diesen Zellen mit benachbarten CD4-Zellen führt. Es resultiert ein Synzytiumverband, bei dem die einzelnen Zellen verschmelzen, mehrere Zellkerne enthalten, keine Zellgrenzen mehr aufweisen und durch ihre verletzliche Zellmembran leicht zugrunde gehen [131].

Die beschriebenen direkten zytopathischen Effekte des HI-Virus sind mengenmäßig eher gering und sicherlich nicht der Hauptgrund für den Verlust der CD4-Zellen und die Zerstörung des Immunsystems. Der immunologische Ansatz geht daher mehr von indirekten Mechanismen aus, die über verschiedene Wege die Apoptose induzieren. Eine Möglichkeit besteht in der zytolytischen Aktivität des transmembranösen Glykoproteins Fas (CD95-Rezeptor, Apo-1) und seiner Interaktion mit dem Fas-Liganden [29, 59, 78, 87, 127]. Die Stimulation des T-Zell Antigenrezeptors TCR/CD3 führt zur Expression des Fas-Rezeptors und dessen Liganden auf stimulierten Zellen. Bei der HIV Infektion scheint eine Dysregulation des Fas/Fas-Ligandensystems mit einem Überangebot an Fas-Rezeptor vorzuliegen [55, 120]. Vielleicht tragen die CD4-Zellen schon vor dem Antigenkontakt eine große Menge an reaktionsbereiten Fas-Rezeptoren. Es gibt Hinweise darauf, daß die Fas-Rezeptor- und Fas-Liganden Produktion gesunder Zellen durch bestimmte Produkte HIV-infizierter Zellen stark gesteigert wird und so eine gesteigerte Apoptose verursacht [55, 78]. Das Hüllprotein gp120 des HI-Virus bindet an den CD4-Rezeptor (TCR/CD3) der CD4-Zelle. Gegen gp120 gerichtete Antikörper vermögen nun zwei CD4-Moleküle miteinander zu vernetzen. Dadurch erhöht sich offenbar die Apoptoseneigung der

betreffenden Zelle, vielleicht weil sie nun verfrüht funktionsfähige Fas-Rezeptor Moleküle aufweist. Eine derart vorbereitete T-Zelle würde einerseits apoptotisch zerfallen, sofern sie auf eine andere aktivierte T-Zelle mit Fas-Liganden träfe. Andererseits ist sie auch in Gefahr, wenn diese aktivierte T-Zelle einem passenden Antigen begegnet, weil sie den Liganden dann selbst herstellt [6, 11, 78, 87].

Eine andere Hypothese geht von einer Induktion der Apoptose durch das HIV-1 Tat-Protein aus [149]. Das von infizierten Zellen sezernierte HIV-1 Tat-Regulator-Protein hat die Aufgabe, sich an eine spezifische HIV-1 RNA Sequenz (Tar) zu binden. Dadurch wird die reverse Transkription von RNA zu DNA verstärkt und stabilisiert. Ohne Tat-Tar Interaktion kann nur wenig oder gar kein virales Protein produziert werden. Wird nun das Tat-Protein von nicht infizierten T-Zellen aufgenommen, bewirkt dies ebenfalls eine erhöhte Produktion von Fas-Rezeptor und Fas-Ligand und damit eine erhöhte Apoptoserate. Allerdings induziert das Tat-Protein nicht in allen Zellen die Apoptose; Monozyten z.B. bleiben im Gegensatz zu T-Lymphozyten verschont [73, 149].

Ein weiterer Faktor, der zur gesteigerten Apoptose bei der HIV-Infektion führt, ist die Produktion des p53 Proteins durch HIV-infizierte Zellen als Reaktion auf die Schädigung der Zelle durch das Virus. Andererseits ist es denkbar, daß freie Sauerstoffradikale, gebildet von inflammatorischen T-Zellen, die in den Lymphknoten HIV-positiver Patienten kumulieren, die Apoptose durch Schädigung der DNA oder Membranen der Zellen induzieren [12, 100].

Der programmierte Zelltod während einer Virusinfektion ist ein wichtiger Verteidigungsmechanismus des Körpers gegen die Infektion und deren Ausbreitung. Natürliche Killerzellen binden sich an virusbefallene Zellen und geben dort das Protein Perforin ab, welches in die Außenmembran der Zielzelle eingebaut wird. Es entstehen Poren in der Zellmembran, durch die die zweite Gruppe der von den natürlichen Killerzellen abgegebenen Proteine, die Granzyme eindringen. Diese Granzyme aktivieren die ICE-artigen Proteasen im Inneren der Zielzelle und lösen so die Apoptose aus. Die Granzyme können ebenfalls mit Kalziumionen kooperieren, die durch die perforierte Zellmembran eingedrungen sind und so einen nekrotischen und nicht einen apoptotischen Zelltod auslösen [7, 155].

Bei *in vitro* Untersuchungen des peripheren Blutes HIV-positiver Patienten fand sich eine deutlich erhöhte Apoptoserate der mononukleären Zellen, die deutlich mit der Krankheitsprogression, dem Stadium der Erkrankung und dem sich verschlechternden Immunstatus korrelierte [93, 147]. Die Apoptoserate von Lymphozyten im peripheren Blut HIV-positiver Patienten ist im Vergleich zu gesunden, HIV-negativen Personen signifikant erhöht [147]

In Lymphknoten HIV-positiver Patienten zeigte sich im Vergleich zu Lymphknoten HIV-negativer Patienten eine drei- bis vierfach höhere Apoptoserate. Die apoptotischen Zellen fanden sich bei HIV-negativen Lymphknoten vor allem in den Keimzentren, wohingegen in den HIV-positiven Lymphknoten die apoptotischen Zellen in allen funktionellen Kompartimenten (z.B. Kortex, Parakortex und Sinus) vorhanden waren und sich nicht nur auf die Keimzentren beschränkten. Es fand sich eine Korrelation zwischen der allgemeinen Aktivierung des lymphatischen Gewebes, d.h. des generellen Zustandes des Immunsystems während der HIV-Infektion und der Intensität der Apoptose. Es bestand aber weder ein Zusammenhang mit der Intensität der Apoptose und dem klinischen Stadium der Infektion noch mit der Viruslast in den Lymphknoten [86].

Der apoptotische Zerfall beschränkte sich nicht nur auf die CD4-Zell-Population, sondern fand sich auch in CD8-Zellen und in der B-Zell-Population. Trotz der erhöhten Apoptoserate der CD8-Zellen findet sich in dieser Zellpopulation, im Gegensatz zum Verlust der CD4-Zellen während der Infektion, eine stabile oder sogar steigende Zellzahl in den Lymphknoten, die wahrscheinlich auf eine übermäßige Stimulation der CD8-Zellen durch Makrophagen zurückzuführen ist [13].

2.1.4. Einfluß von Interleukin-2 und einer antiretroviralen Therapie auf die Apoptose

Cordiali-Fei et al. zeigten in *in vitro* Versuchen mit kultivierten Lymphozyten aus dem peripheren Blut HIV-positiver Patienten, daß Interleukin-2 einen protektiven Effekt gegenüber dem programmierten Zelltod aufweist [26]. Hashimoto et al. [46], wie auch Adachi et al. [2] zeigten ebenfalls in *in vitro* Versuchen, daß durch hohe Fas-Rezeptor Produktion das Bcl-2 Protein als antiapoptotischer Zellregulator vermindert exprimiert wird und vice versa durch eine hohe Bcl-2 Konzentration der Fas-Rezeptor vermindert produziert wird. Bei hoher Fas-Rezeptor Produktion kann das apoptosehemmende Protein Bcl-2 die T-Zelle nicht mehr vor dem Zelltod bewahren. Es konnte gezeigt werden, daß die exogene Zugabe von Interleukin-2 zu einem Anstieg der Bcl-2 Konzentration führte und mit einem Anstieg der überlebenden T-Zellen einherging [2, 46].

Andere Untersuchungen zeigten aber, daß Interleukin-2 bei Mäusen die Empfindlichkeit für den apoptotischen Zelltod in CD4- und CD8-Lymphozyten erhöht [70]. Fournel et al. [39] untersuchten den Einfluß von IL-2 auf das für die Induktion der Apoptose verantwortliche Fas-Rezeptor/Fas-Liganden System. Sie fanden unter Zugabe von IL-2 eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen auf Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose; der Grad der Fas-Rezeptor Expression auf den Zellen war jedoch von der IL-2 Zugabe unabhängig.

Bei der Analyse der Fas-Rezeptor/Fas-Ligand Interaktion bei HIV-Patienten vor und nach Einleitung einer antiretroviralen Therapie zeigte sich eine deutliche Reduktion der Empfindlichkeit auf Fas-Rezeptor vermittelte Apoptose in peripheren T-Lymphozyten nach Einleitung der HAART. Diese korrelierte mit einer parallelen Senkung der Viruslast und einem Anstieg der CD4-Zellen. Im Lymphgewebe fand sich jedoch keine Reduktion der Fas-Liganden Expression [10].

Pandolfi et al. berichten im Rahmen einer Studie mit 22 HIV-positiven asymptomatischen HIV-Patienten über eine Reduktion der lymphozytären Apoptoserate und einen parallelen Anstieg naiver CD4-Zellen im peripheren Blut unter HAART in Kombination mit niedrig dosiertem subkutan verabreichten IL-2 [92].

2.2. Zellaktivierung und Zellproliferation

2.2.1. Einfluß einer antiretroviralen Therapie auf die T-Zell-Dynamik

Die Aktivierung des Immunsystems stellt eine essentielle Komponente einer angemessenen Immunantwort auf ein fremdes Antigen dar. Das Immunsystem befaßt sich mit dem Antigen und erkennt es. Danach tritt es wieder in ein Stadium der relativen Ruhe ein, bis ein nächster Stimulus erfolgt. Dies ist für den optimalen Ablauf einer Immunantwort grundlegend.

Die Entdeckung, daß das HI-Virus CD4-Rezeptoren als primäres Molekül zum Eindringen in die Zelle benutzt, bot eine einfache Lösung auf die Frage, warum die CD4-Zellzahlen während der HIV-Infektion stark abfallen. Gemäß dieser Theorie infiziert HIV nur die CD4-Zellen und lysiert diese in der aktiven Phase der HIV-Replikation. Die CD4-Zellen stellen den Pool mit der höchsten Virusreplikation dar. Hier entstehen ca. 99% aller Viren. Den anderen Pool mit einer wesentlich geringeren Replikationsrate stellen Makrophagen und dendritische Zellen dar [99]. Die HIV-Infektion ist eine extrem proliferative Erkrankung, während der täglich etwa 10 Milliarden Viren gebildet werden [53]. Gleichzeitig vernichtet das Immunsystem täglich eine bis zehn Milliarden Viren, das sind 30% der gesamten Virusmenge. Die täglichen Raten des Virusabbaus und der Virusreplikation halten sich in etwa die Waage. Um die Infektion in Schach zu halten ist der Umsatz der CD4-Zellen bei HIV-positiven Patienten um das 70-fache gesteigert. Pro Tag findet eine Zerstörung und Neubildung von 10^9 Zellen statt, dies entspricht etwa 5% des gesamten CD4-Zell-Pools. Folglich sollte nach Eliminierung des Virus aus dem Körper eine Erholung der CD4-Zell-Population eintreten und zu einer Wiederherstellung des Immunsystems der infizierten Person führen. Genau zu diesem Ergebnis kamen zwei Arbeitsgruppen von Ho et al. und Wei et al. [53, 148].

Sie vertraten die Ansicht, daß eine hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) zum sofortigen und starken Anstieg der CD4-Zellzahlen durch Verhinderung der virusinduzierten Zytolyse und gleichzeitiger CD4-Zellproliferation führt. Aufgrund dieser relativ einfachen Hypothese und des darauffolgenden großen Interesses wurden mehrere kritische Untersuchungen durchgeführt.

Wolther et al. [152] beobachteten keine signifikante Verkürzung der Telomerlänge in CD4-Zellen bei HIV-positiven Patienten, was als Ausdruck einer aktiven Teilung der

Zellen bei erhöhtem Zellumsatz zu erwarten wäre. Weitere Studien wurden u.a. von Pakker et al. [91] und Gorochov et al. [42] durchgeführt. Diese Arbeiten ergaben umfassende Daten zur Umbildung der T-Zell-Kompartimente bei HIV-Infizierten nach HAART und widerlegten die Hypothese, nach der die Zerstörung des Immunsystems nur durch den Verlust HIV-infizierter T-Zellen bedingt ist.

In frühen HIV-Stadien fällt die Anzahl der CD4-Zellen ab, aber die Anzahl der CD8-Zellen, inklusiv der Gedächtnis- und aktivierten CD8-Zellen steigt an (Roederer et al. [107]). Die Anzahl naiver CD4- und naiver CD8-Zellen fällt im Blut ab, obwohl CD8-Zellen nicht das Ziel für das HI-Virus sind [106] und naive CD4-Zellen relativ resistent gegen HIV sind [108, 133, 153]. Von daher kann dieser Abfall nicht durch direkte HIV-vermittelte Zytolyse verursacht sein. Nicht nur die naiven, sondern auch die CD4-Gedächtniszellen, später auch die CD8-Gedächtniszellen fallen in späteren HIV-Stadien ab [106]. Aktivierte T-Zellen findet man normalerweise in peripheren Geweben. Deren Evasion ins periphere Blut bei HIV-positiven Patienten ist ein Anzeichen für eine aktive Immunantwort in späten Stadien der Infektion. Die zunehmende Ausschwemmung dieser Zellen ins Blut während der Infektion kann z.B. durch die zunehmende Zerstörung der Lymphknotenarchitektur bedingt sein oder durch homöostatische Mechanismen, mit denen der Körper versucht, den Verlust der naiven und Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut zu kompensieren [19, 22]. Nach Beginn der HAART steigt nach einigen Wochen die Anzahl der B-Zellen, CD4-Zellen und CD8-Zellen im Blut an. Genauere Untersuchungen zur Immunophänotypisierung zeigten aber, daß dieser Zellanstieg auf T-Gedächtniszellen und B-Zellen beschränkt ist. Gerade diese Zellen können aber lange in den Lymphknoten verweilen. Naive T-Zellen und natürliche Killerzellen steigen nach HAART nicht bzw. nur sehr zeitverzögert an. Diese Zellen verweilen nicht in den Lymphknoten und können somit nicht direkt als Antwort auf die HAART ins Blut ausgeschwemmt werden.

Pakker et al. [91] argumentierten, daß dieser frühe Anstieg der Zellanzahl kurz nach HAART ein Beweis für die T-Zell-Umverteilung sei und nicht für die T-Zell-Neuproduktion. Nach dieser Umverteilungshypothese [15, 85, 134] wird während der akuten viralen Replikation und der begleitenden Immunantwort eine große Menge von B- und T-Zellen in peripheren Geweben „gefangen“ (z.B. durch Antigene, Zytokine oder chemokine Signale). Nach Beginn der HAART und der systemischen Vernichtung der HI-Viren reduziert sich der Gehalt an proinflammatorischen

Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , MIP-1 α) was zu einer Reduktion des Aktivierungsgrades des Immunsystems führt. Hiernach werden die Zellen aus den entzündeten Lymphknoten ins Blut ausgeschwemmt [15].

Pakker et al. [91] und Mosier et al. [85] formulierten die Hypothese, daß der Grad des „Gefangenhaltens“ der Zellen im peripheren Gewebe („Trapping“) mit dem Fortschreiten der HIV-Infektion und mit steigender Viruslast zunimmt. Diese relativ einfache Hypothese erklärt, warum der Zellanstieg im Blut nach HAART bei Patienten mit wenig CD4-Zellen stärker ausgeprägt zu sein scheint, als bei Patienten mit einem besseren CD4-Zellstatus. Diese Tatsache kann nicht durch die Modelle erklärt werden, die die proliferative Expansion der T-Zellen favorisieren, da hier die Wiederherstellung der CD4-Population proportional zur Ausgangszellzahl sein sollte. Die funktionelle Wiederherstellung der T-Lymphozyten ist erst dann komplett, wenn das Repertoire der T-Zell-Rezeptoren wiederhergestellt ist, so daß alle potentiellen Antigene wieder erkannt werden können. Der Abfall der naiven und Gedächtnis-T-Zellen während des Krankheitsverlaufs bedeutet eine zunehmende Restriktion dieses Repertoires und endet schließlich in der Immundefizienz. Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire bei HIV-positiven Patienten ist im Vergleich zu gesunden Probanden in der Verteilung deutlich gestört. Diese Störung ist durch zwei verschiedene Mechanismen bedingt. Zum einen durch den Verlust von T-Zell-Klonen und zum anderen durch die Expansion von Antigen-spezifischen Klonen, die ein Überangebot bestimmter Rezeptortypen verursacht [24, 42].

Weiterhin zeigte sich nach erfolgreicher HAART d.h. Viruslastsenkung, eine gewisse Wiederherstellung des CD4-, aber nicht des CD8-Rezeptor-Repertoires [42]. Der offenbare Anstieg der T-Rezeptorvielfalt nach Eliminierung des Virus ist durch die Vernichtung von aktivierten T-Zellen einschließlich der expandierten HIV-spezifischen Klone zu erklären. Durch die Produktion naiver T-Zellen vervielfältigt sich das T-Zell-Rezeptor-Repertoire weiter. Wie Autran et al. [9] und Pakker et al. [91] zeigten, stieg die Anzahl der naiven T-Zellen langsam über eine Zeit von 6 Monaten nach Beginn der HAART an. Dies zeigt, daß die HAART in der ersten Zeit nach Beginn für die Wiederherstellung der T-Zell-Immunität ursächlich ist, allerdings nur bei Patienten, die eine deutliche Viruslastsenkung unter Therapie zeigten. Bei Patienten, bei denen die HAART nur mangelhaft ansprach, kam es zu einem Rückfall mit Verlust von T-Zellen und einer Restriktion des Rezeptor-Repertoires. Die

Wiederherstellung der CD4-Zellzahl unter antiretroviraler Therapie ist also ein dynamischer Vorgang, den man grob in zwei Phasen einteilen kann. Zuerst zeigt sich ein relativ rascher Anstieg der T-Gedächtniszellen, gefolgt von einem über Monate dauernden langsamen Anstieg der naiven T-Zellen [9, 15]. Erklärbar wäre dieser späte Anstieg naiver T-Zellen möglicherweise durch eine progressive Wiederherstellung des Thymus im Menschen [141].

Fleury et al. [38] untersuchten Blut und Lymphknoten HIV-positiver Patienten mittels des Proliferationsmarkers MIB-1 auf die Frage, wie sich eine HAART auf die Proliferation von Lymphozyten auswirkt. Sie fanden keinen Anstieg der proliferierenden CD4-Zellen im Blut und Lymphknoten in der frühen Phase, d.h. 2 Wochen unter HAART. In der Spätphase, 24-36 Wochen nach Beginn der HAART, fanden sie einen Anstieg der proliferierenden CD4-Zellen in Blut und Lymphknoten. Sie schlußfolgerten daraus, daß in der frühen Phase nach Beginn der HAART der Anstieg der CD4-Zellzahl durch eine Umverteilung aus dem peripheren Gewebe bedingt ist und 24-36 Wochen nach Beginn der HAART eine echte Proliferation der CD4-Zellen stattfindet. Tissot et al. [141] konnten jedoch bei ihren Untersuchungen von 50 HIV-positiven Patienten unter einer Dreifach-Therapie keinen Anstieg der Proliferation von T-Zellen im Blut als Effekt der HAART nachweisen. Die Anzahl der proliferierenden T-Zellen korrelierte aber mit dem Auftreten von opportunistischen Infektionen in der Spätphase der HIV-Infektion. Auch Orendi et al. [88] zeigten, wie zuvor schon Sachsenberg et al. [115], eine erhöhte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 auf CD4- und CD8-Lymphozyten im Blut HIV-positiver Patienten im Gegensatz zu gesunden Probanden. Ebenso korrelierte die Expression des Ki-67 mit dem Aktivierungsmarker HLA-DR. Orendi et al. schlossen daraus, daß im natürlichen Verlauf der HIV-Infektion die Replikation des HI-Virus zu einer generellen T-Zell-Aktivierung führt und opportunistische Infektionen eine zusätzliche CD4-Zell-Aktivierung und Virusreplikation hervorrufen. Tenner-Racz et al. [137] zeigten ebenfalls in Lymphknoten HIV-positiver Patienten eine erhöhte Proliferationsrate, vor allem der CD4-Gedächtniszellen im Gegensatz zu gesunden Probanden.

Bei allen Untersuchungen muß man aber bedenken, daß sich der Zustand des Immunsystems im Blut nur unzureichend widerspiegelt, da sich etwa 95% der Lymphzellen in den Lymphorganen befinden und die Verteilung der Zellen zwischen

den Kompartimenten Blut und Lymphsystem im Verlauf der HIV-Infektion einer dynamischen Änderung unterliegt. Dabei überrascht es nicht, daß der Abfall der CD4-Zellen im Blut weit größer ist als in den Lymphknoten [112]. Weiterhin ist das Endstadium der HIV-Infektion durch eine Umkehrung der CD4/CD8-Ratio gekennzeichnet, welche im Lymphknoten weit später auftritt als im Blut [112]. Es ist jedoch nach wie vor schwierig, die Dynamik aller Lymphozytensubpopulationen während des Krankheitsverlaufs und Therapie detailliert zu bestimmen. Neuere Arbeiten von Hellenstein et al. [47] bestimmten die Halbwertszeit von CD4-Zellen HIV-infizierter Patienten (ungefähr 20-30 Tage) und deren Produktionskinetik.

Das Ziel der HIV-Therapie sollte also nicht nur die Viruselimination aus dem Körper sein, sondern auch die Entwicklung von Therapien, die durch das Eingreifen in die Homöostase und die T-Zell Produktion das Immunsystem wiederherstellen. Deshalb wäre es sinnvoll, den Krankheitsprogreß durch die Kombination der HAART zur Viruslastsenkung mit einem immunologischen Ansatz zur Stimulation der T-Zellen zu verhindern.

Ein vielversprechender Ansatz zur Viruseradikation scheint der Einsatz von Interleukin-2 in Hinblick auf die Tatsache zu sein, daß dieser potente Immunaktivator fähig ist, ruhende T-Zellen, die große Mengen HI-Viren beherbergen, die für die antiretrovirale Therapie nicht zu erreichen sind, zu aktivieren, um so das HI-Virus für die HAART angreifbar zu machen [20, 104]. Man muß hierbei jedoch bedenken, daß das HI-Virus auch in anderen Reservoirs, wie ZNS, Gastrointestinaltrakt oder in anderen Immunzellen, z.B. Makrophagen vorkommt, die im allgemeinen nicht von IL-2 aktiviert werden [20, 36, 151].

Unabhängig von der Tatsache, daß das HI-Virus das CD4-Antigen als primären Rezeptor benutzt und die CD4-Zellzahl bei AIDS stark abfällt, ist HIV eine Erkrankung, die zu einer progressiven Zerstörung aller T-Zell-Subklassen führt. AIDS ist also eine Erkrankung einer gestörten Homöostase. Nur durch das Verständnis der Regulationsmechanismen im T-Zell-System des Körpers können die Mechanismen des HI-Virus aufgedeckt werden, die zur Zerstörung des Immunsystems führen.

2.3. Interleukin-2

2.3.1. Immunmodulation durch Interleukin-2 bei der HIV Infektion

Schon in den achtziger Jahren wurde, unter anderen, von der Arbeitsgruppe um Dr. H. Clifford Lane am National Institute of Health, Bethesda, der Stellenwert des T-Zell Mitogens Interleukin-2 im Rahmen der HIV Infektion erkannt [37, 68, 145]. Anfang 1991 und 1992 wurde von Thomas Merigan die Sicherheit und das Nebenwirkungsprofil von intravenös verabreichtem IL-2 zusammen mit Zidovudin (Retrovir®) an HIV-Patienten (>400 CD4-Zellen/ μ l) in Dosisfindungsstudien dokumentiert [21, 123]. Es fanden sich ein signifikanter, transienter Anstieg der CD4-positiven Lymphozyten und eine Verminderung der HIV Replikation (p24-Antigen). Die bis dato beschriebene immunstimulatorische Wirkung von IL-2 wurde durch funktionelle Ergebnisse der T-Zell-Immunität vom verzögerten Typ („delayed type hypersensitivity“) und durch eine Erhöhung an natürlichen Killerzellen (CD56-positiv) von Hedy Teppler ergänzt [138].

Die erste Phase I-Studie mit subkutaner Applikation wurde 1994 von McMahon et al. an HIV-Patienten mit 80-330 CD4-Zellen/ μ l durchgeführt [80]. Sie stellten fest, daß nach Verabreichung von IL-2 eine bis zu 10 Wochen nachweisbare Erhöhung der CD4- bzw. CD8-Zellen und der natürlichen Killerzellen nachzuweisen war. Eine Aktivierung von HIV war bei den meisten behandelten Patienten nicht festzustellen.

1995 erschien Dr. Lane's Publikation, in der er über 25 HIV-Patienten berichtete, die in einer offenen Studie intravenös mit IL-2 in verschiedenen Dosierungen über variable Zeiträume behandelt wurden [65]. Die immunologische Veränderung, die bei den meisten Patienten beobachtet wurde, entsprach einem 3- bis 5-fachen Anstieg der zirkulierenden Lymphozyten. Die Proliferation der CD4-Zellen scheint nicht im Knochenmark oder Thymus abzulaufen, sondern im peripheren Blut. Vor allem naive CD4-Zellen scheinen erneut den Vermehrungszyklus zu durchlaufen und ein immunologisches Gedächtnis anzulegen [113]. Neben dem dauerhaften Anstieg der CD4-Zellen bei 6 von 10 Patienten mit bei Studienbeginn mehr als 200 CD4-Zellen/ μ l wurde zudem eine Vermehrung vieler Klone des T-Zellsystems gezeigt, was klinisch einer verbesserten Erkennung von Antigenen entsprechen dürfte. Außerdem wurde eine Reduktion der Aktivierungsniveaus des zellulären Immunsystems gefunden, was einer Entlastung des Immunsystems gleichzusetzen ist. Die Daten hinsichtlich der

viralen Belastung im Blut waren nicht einheitlich; sie unterschieden sich zwischen Patienten mit mehr oder weniger als 200 CD4-Zellen/ μ l. Während diese vorläufigen Ergebnisse einen vorteilhaften Effekt des IL-2 bei Patienten mit einer HIV-Infektion und CD4-Zellzahlen über 200/ μ l demonstrierten, ist die Langzeitwirkung der IL-2 Therapie im Hinblick auf die CD4-Zellzahlen und Virusbelastung bis heute unbekannt. Diese Befunde haben insbesondere deshalb große Bedeutung, da sich durch Verbesserung der Funktion und durch Vermehrung des T-Zell Immunsystems möglicherweise ein entscheidender Schritt in der Therapie des Immundefizits bei HIV abzeichnet und davon ein klinischer Langzeitvorteil resultieren kann. Nach aktuellsten Daten im Rahmen der Nachbeobachtung von mittlerweile 3 Jahren scheint ein Trend der Reduktion opportunistischer Komplikationen in der Gruppe der mit IL-2 behandelten Patienten erkennbar zu sein. Der Effekt einer subkutanen IL-2 Therapie bei HIV-positiven Patienten mit CD4-Zellzahlen zwischen 50/ μ l und 300/ μ l auf opportunistische Infektionen ist zur Zeit unter anderem Gegenstand der Untersuchung der SILCAAT-Studie [126].

Im Reagenzglas kann IL-2 den programmierten Zelltod (Apoptose) von Lymphozyten beeinflussen und die natürliche Killerzellaktivität steigern [139, 157]. Des weiteren ist eine Zunahme der zytotoxischen Wirkung von Lymphozyten gegen Cytomegalieviren (CMV) [110] beschrieben, deren Prophylaxe und Therapie bei HIV- und immunsupprimierten Transplantationspatienten enorme Probleme bereitet und eine hohe Mortalität besitzt.

Die dosis-limitierende Toxizität von IL-2 wurde bei Patienten mit Nierenzellkarzinom und Melanom sowie bei HIV-Patienten untersucht [21, 56, 77, 102, 111, 123, 125]. Es fanden sich häufig Muskelschmerzen, Gelenkschmerzen, Müdigkeit und Fieber. Seltener wurden eine Erhöhung der Nierenfunktionswerte, der Leberenzyme sowie eine Verminderung der Leukozyten und Thrombozyten festgestellt. Weitere seltene Nebenwirkungen waren Anämie, eine zeitweise Gallenblasenwandverdickung mit rechtsseitigen Oberbauchbeschwerden, Schilddrüsenfunktionsstörungen, kognitive Störungen, Kurzatmigkeit durch Volumenbelastung, Kathetersepsis, Lymphknotenschwellung, Übelkeit, Erbrechen, Hautausschläge und Veränderungen des Blutdrucks. Viele dieser Nebenwirkungen sind Folge des „capillary leak

syndromes“, bei dem es zum Austritt von Flüssigkeit in das extrazelluläre Gewebe kommt. Ebenfalls wurde gelegentlich ein Mangel an Natrium, Kalzium und Magnesium beobachtet. Generell waren die Nebenwirkungen nach Absetzen des IL-2 innerhalb von Tagen reversibel.

Eine Hauptsorge bei der Behandlung von HIV-Patienten ist das theoretische Risiko einer gesteigerten Vermehrung von HIV unter der IL-2 Therapie. Die Virusbelastung, die durch Kultur von Plasma und/oder das p24-Antigen gemessen wurde, stieg in den vorliegenden Studien während der Behandlung mit IL-2 im allgemeinen nicht meßbar an. Jedoch fand sich am Ende der IL-2 Infusionen im Plasma ein mittels des sehr empfindlichen branched-DNA Tests gemessener Anstieg der Viruskonzentrationen [65]. Erhöhungen der Viruskonzentration traten 1-3 Tage nach der Beendigung der IL-2 Infusionen auf und kehrten nach ca. 2 Wochen wieder auf den Ausgangswert zurück. Eine konstante Erhöhung des p24-Antigens oder der mittels des branched-DNA Tests gemessenen Viruslast von HIV-1 im Plasma fand sich nicht. Lediglich bei einigen Patienten mit einer CD4-Zellzahl unter 100/ μ l zeigte sich eine andauernde Erhöhung dieser Parameter.

In einer experimentellen Studie von Kutza et al. [67] wurden Zellen von HIV-negativen Probanden *in vitro* mit IL-2 vorbehandelt und anschließend mit HIV-1 infiziert. Es konnte gezeigt werden, daß die HIV-1 Replikation, gemessen an der Aktivität der reversen Transkriptase (RT), in Makrophagen durch Interleukin-2 Gabe erheblich vermindert werden konnte [67]. IL-2 bewirkte bei Gesunden eine verminderte Synthese des von dem HI-Virus benutzten CD4-Rezeptors und des CCR5-Rezeptors, der von Makrophagen-tropen HIV-1 benutzt wird. Eine Infektion von Makrophagen mit HIV wird durch das verminderte Angebot an Korezeptoren erschwert. Makrophagen, die erst nach der Infektion mit IL-2 behandelt wurden, zeigten diesen Effekt kaum [67].

Der *in vivo* Effekt von IL-2 auf die Chemokin-Rezeptor Expression war bisher unbekannt. Zou et al. [158] zeigten *in vivo* bei 30 HIV-positiven Patienten einen deutlichen Anstieg der Chemokin-Rezeptoren CCR5 und CCR2b auf CD4-Zellen nach fünftägiger IL-2 Gabe. Die dadurch bedingte Stimulation der HIV-Replikation konnte aber gut mit einer antiretroviralen Therapie beherrscht werden.

2.3.2. Interleukin-2-Rezeptoren

Im Modell der Maus wurde postuliert, daß ungeprägte murine T-Helferzellen (T_{HP}), die zuvor noch nie stimuliert wurden, ausschließlich Interleukin-2 als Lymphokin synthetisieren. Eine kurze Stimulation führt zur Entwicklung von T-Helfer-0-Zellen (T_{H0}), die ein weites Spektrum an Zytokinen freisetzen können. Nach adäquater Stimulation, wie sie auch bei einem HIV-Infekt auftreten kann, entstehen die spezialisierten T-Helfer-1-Zellen (TH_1) und T-Helfer-2-Zellen (TH_2). Bei der HIV-Infektion ist das Gleichgewicht unter den T-Zellen gestört. Neben der Überexpression der TH_2 -Zellen liegt ein selektiver Defekt der TH_1 -Antwort vor, durch den es zu einem Mangel an den Zytokinen Interleukin-2 und Interferon- γ kommt, welche normalerweise von den TH_1 -Zellen produziert werden [79]. Diese TH_1/TH_2 -Imbalance persistiert auch nach einer einjährigen hochaktiven antiretroviralen Therapie [79].

Das IL-2/IL-2-Rezeptorsystem nimmt eine zentrale Rolle in der T-Zell-Proliferation ein, indem es die Stärke und Dauer der T-Zellantwort reguliert. IL-2-Rezeptoren werden aus zwei Polypeptiden (α - und β -Ketten) gebildet. Die α -Kette ist ein niedrigaffiner Rezeptor mit 55 kDa (CD25), die β -Kette besteht aus einem größeren (75 kDa) Molekül von mittlerer Affinität [146]. Es sind drei Formen von IL-2-Rezeptoren bekannt. Zum einen der hochaffine IL-2-Rezeptor, bestehend aus der α -Kette und aus der β -Kette, welche ein Heterodimer bilden ($IL-2R\alpha + IL-2R\beta$); zum anderen der niedrigaffine IL-2-Rezeptor ($IL-2R\alpha$), der nur die α -Kette enthält, nicht aber die β -Kette. Die dritte Untergruppe ist der mittelaaffine IL-2-Rezeptor ($IL-2R\beta$), der nur aus der β -Kette besteht, nicht aber aus der α -Kette [146]. Die Bedeutung der γ -Kette hinsichtlich der IL-2 Rezeptorfunktion ist noch nicht hinreichend geklärt.

Der niedrig- und hochaffine IL-2-Rezeptor wird auf aktivierten T-Lymphozyten, wie CD4-Zellen, CD8-Zellen, B-Zellen und Monozyten exprimiert [124]. Der mittelaaffine IL-2-Rezeptor wird auf der Zellmembran von ruhenden granulären Lymphozyten und in einer geringen Anzahl auf T-Lymphozyten, vor allem CD8-Zellen, exprimiert [124]. Ruhende T-Zellen besitzen eine kleine Anzahl (ca. 500) von mittelaaffinen IL-2-Rezeptoren.

Nach Aktivierung, d.h. nach einer Interaktion zwischen Antigen-präsentierender Zelle (APC) und T-Zell-Rezeptor (TCR), werden die α -Ketten im Vergleich zu den β -

Ketten verstärkt produziert, so daß am Ende ungefähr 50000 α -Ketten und bis zu 5000 β -Ketten auf jeder aktivierten T-Zelle vorhanden sind. Bei den meisten CD4-Zellen und den CD8-Zellen besteht für 1-2 Tage eine vorübergehende IL-2 Produktion. Über die hochaffinen und mittelaaffinen IL-2-Rezeptoren wird das Wachstum der T-Zellen wirksam stimuliert, wohingegen die niedrigaffinen IL-2-Rezeptoren die Zellen nicht direkt über ein mitogenes Signal durch IL-2 aktivieren, sondern über einen indirekten Mechanismus, der im folgenden beschrieben wird:

Die β -Kette allein, als IL-2-Rezeptor mittlerer Affinität, kann in Anwesenheit von hohen IL-2-Konzentrationen an der Aktivierung beteiligt sein, insbesondere auf natürlichen Killerzellen (NK), die im Gegensatz zu anderen nicht aktivierten T-Zellen schon im Ruhezustand bis zu 5000 β -Ketten aufweisen. Deshalb führt die direkte Stimulation mit IL-2 zur schnellen Aktivierung von NK-Zellen. Im Gegensatz dazu exprimieren die anderen T-Zellen im Ruhezustand nur bis zu 500 β -Ketten des IL-2-Rezeptors und binden IL-2 mit mittlerer Affinität. Als Antwort auf die Anwesenheit des IL-2 wird die Expression des α -Ketten kodierenden Gens erhöht. Mit dieser Induktion der α -Kettenproduktion wandeln sich die Zellen, die nur mittelaaffine IL-2-Rezeptoren exprimiert haben, in Zellen um, die nun hochaffine Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Mit einer zeitlichen Verzögerung, die in der ersten Phase durch die IL-2-induzierte α -Kettenproduktion zustande kommt, werden diese T-Zellen auch aktiviert und proliferieren.

IL-2 wirkt also nicht nur auf die CD4-Zellen selbst, sondern stimuliert auch die Vorläufer der zytolytischen CD8-Zellen. Diese produzieren nach Aktivierung durch Antigenkontakt und IL-2 zusätzlich IL-2 Rezeptoren mit besonders hoher Affinität zu IL-2. Nach entsprechend starker Stimulation vermehren sie sich und reifen zu zytolytischen Effektorzellen aus. Die ausgereiften CD8-Zellen können nun Zielzellen zerstören, die Fremdanigen in Verbindung mit Klasse-I-Molekülen exprimieren. Außerdem benötigen sie jetzt weit niedrigere Konzentrationen des IL-2, um weiterhin im aktivierten Zustand zu bleiben.

Nach ihrer Induktion verbleiben IL-2 Rezeptoren 6 bis 7 Tage auf der Zelloberfläche und tragen so dazu bei, das T-Zell-Wachstum zu limitieren, wenn die Expression nicht durch T-Zell-Aktivierung reinduziert wird. Bei geeigneter Stimulation sezernieren T-Zellen IL-2, das mit IL-2 Rezeptoren interagiert und das Zellwachstum vermittelt.

Dies kann auf autokrine Weise geschehen, indem T-Zellen IL-2 freisetzen und es selbst über die eigenen IL-2 Rezeptoren wieder anlagern, oder auf parakrine Weise, wobei T-Zellen IL-2 produzieren, das von benachbarten Zellen aufgenommen wird.

Neben den membrangebundenen IL-2 Rezeptoren sind lösliche IL-2 Rezeptoren (sIL-2R α) bekannt. Dieses lösliche Molekül entsteht wahrscheinlich durch einen enzymatischen Prozeß aus den membrangebundenen niedrigaffinen IL-2 Rezeptoren. Der lösliche Rezeptor ist kleiner als der membrangebundene (45 kDa versus 55 kDa) und bindet ebenfalls IL-2 mit niedriger Affinität [124].

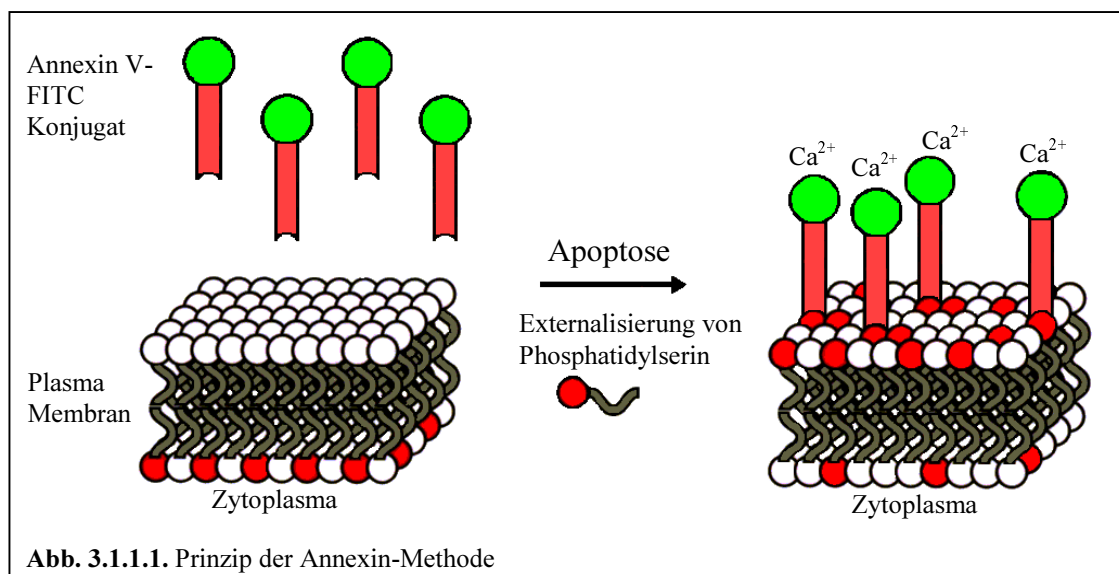
Während der HIV-Infektion und der damit verbundenen chronischen Aktivierung des Immunsystems finden sich erhöhte Serumkonzentrationen des löslichen IL-2 Rezeptors bei 70% der HIV-positiven Patienten. Das Maß der ansteigenden Konzentrationen des löslichen IL-2 Rezeptors scheint ein Index für die Krankheitsprogression bei HIV zu sein [124].

3. Material und Methoden

3.1. Durchflußzytometrische Bestimmung der Apoptose in Blutlymphozyten

3.1.1. Prinzip der Annexin-Methode

In vitalen Zellen ist die Membranintegrität gewährleistet. Phosphatidylserin, ein negativ geladenes Phospholipid der Zellmembran, ragt asymmetrisch in das Zytoplasol der Zelle. Annexin ist ein kalziumabhängiges, phospholipidbindendes Protein, welches eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin aufweist. Der Beginn der Apoptose geht mit einem Verlust der Membranasymmetrie einher, wodurch Phosphatidylserin an die Zelloberfläche gelangt. Somit kann Annexin, welches mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein Isothiocyanat = FITC) gekoppelt ist, in Gegenwart von Kalziumionen an das externalisierte Phosphatidylserin binden (Abb. 3.1.1.1.).



Zur Unterscheidung, welche Zellen des Immunsystems apoptotisch zerfallen, werden rot fluoreszierende (konjugiert mit R-Phycoerythrin = PE) monoklonale Antikörper zur Darstellung der lymphozytären Antigene nach der Cluster Definition (CD) eingesetzt.

Zur Anwendung kommen hier die Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD4 (T-Helferzellen), CD8 (T-Suppressorzellen) und CD56 (natürliche Killerzellen).

Dies stellt eine einfache und praktische Methode dar, um mittels Durchflußzytometrie den frühen Eintritt einer Zelle in die Apoptose zu untersuchen [144].

3.1.2. Verwendete Reagenzien

1. Annexin V FITC Kit (Fa. Coulter), enthält:

- 100 µl Annexin V FITC Stammlösung
- 6 x 1.7 ml zehnfach konzentrierten Bindungspuffer

2. Antikörper:

- Monoklonaler CD4 Antikörper, PE konjugiert (Fa. Coulter #0449)
- Monoklonaler CD8 Antikörper, PE konjugiert (Fa. Coulter #0452)
- Monoklonaler CD56 Antikörper, PE konjugiert (Fa. Coulter #1324)

Alle Antikörper liegen in flüssiger Form (2 ml) vor und sind mit 2 mg/ml Kälberserum in PBS und 0.1%-igem Natriumazid gepuffert.

3. Ficoll-Paque (Pharmacia)

4. PBS (50 mM Natriumphosphat, pH 7.2, 200 ml NaCl)

5. Destilliertes Wasser (Ampuwa[®], Fresenius)

3.1.3. Technische Ausrüstung

1. Durchflußzytometer (Coulter EPICS[®] XL 3-Color FACS)

2. Zentrifuge (Sigma 3 K 18)

3. 5 ml und 15 ml Röhrchen, Serumentrenner, Pipetten (Fa. Eppendorf)

3.1.4. Verwendetes Material

Aus Vollblut isolierte Lymphozyten von 13 HIV-positiven Patienten zu den Zeitpunkten vor Beginn des IL-2-Zyklus (Tag 0) und an den Tagen 3, 7, 14 nach Beginn des IL-2 Zyklus (jeweils 3. oder 4. Zyklus), sowie von 29 HIV-positiven Patienten in verschiedenen Stadien der Infektion ohne IL-2 Therapie und 3 gesunden Probanden als Kontrolle.

3.1.5. Arbeitsschritte

1. Blutentnahme

- Es wurden jeweils 2 x 10 ml EDTA-Blut durch Venenpunktion entnommen.

2. Zellisolation

- a. Abzentrifugieren des Vollblutes in den EDTA-Röhrchen bei 900 g.
- b. Verwerfen des Serumüberstandes.
- c. Verdünnen der verbliebenen zellulären Bestandteile des Blutes mit 3 ml PBS je EDTA-Röhrchen.
- d. Überschichtung eines Ficoll Gradienten mit dem verdünnten Blut und 15-minütige Zentrifugation bei 900 g.
- e. Absaugen der Interphase und dreimaliges Waschen mit PBS bei 4°C. Die gewonnenen Zellen wurden je Probenröhrchen auf eine Zellzahl von 0.5×10^6 Zellen/ml eingestellt und auf Eis gelagert.

3. Zellpräparation

- a. Verdünnen des 10-fach konzentrierten Bindungspuffer mit destilliertem Wasser (1:10) und Lagerung auf Eis.
- b. Resuspension der gewonnenen Zellen in gekühltem Bindungspuffer ($10^5 - 10^6$ Zellen/ml Bindungspuffer).
- c. Verdünnen der Annexin V FITC Stammlösung 1:10 mit gekühltem Bindungspuffer.
- d. Für jede Patientenprobe wurden jeweils 3 Probenröhrchen vorbereitet und mit 475 µl resuspendierten Zellen gefüllt. Pro Röhrchen wurden anschließend 5 µl Annexin und 20 µl des entsprechenden Antikörpers (CD4, CD8, CD56) hinzugegeben.
- e. Inkubation der Proben bei 4°C im Dunkeln für 10 Minuten.
- f. Analyse der Proben im Durchflußzytometer.

4. Analyse im Durchflußzytometer

Für jede Probe wurden 10000 bis 80000 Lymphozyten nach Größe („Forward Scatter“, FSC) und Granularität („Side Scatter“, SSC) im Durchflußzytometer eingegrenzt und mit entsprechender Software analysiert. Durch Verwendung von grünen und roten Fluoreszenzfarbstoffen wurde die Unterscheidung von einfachmarkierten und doppeltmarkierten Zellen ermöglicht. Zur individuellen Einstellung der exakten Grenzen zwischen markierten und unmarkierten Zellen wurde von jedem Patienten eine Negativkontrolle ohne angefärbte Zellen mitgeführt und im Durchflußzytometer analysiert, bevor die eigentliche Messung durchgeführt wurde.

5. Ausdruck der Durchflußzytometeranalyse

Beispielhaft zeigt die obere Spalte (Reihe A) die Probe vor, die untere Spalte (Reihe B) die Probe 7 Tage nach Beginn des IL-2-Zyklus. Dargestellt sind die Einfachmarkierungen mit dem Annexin Antikörper (Abb. 1, Gate C) und dem CD4 Antikörper (Abb. 2, Gate B), sowie die Doppelmarkierung mit beiden Antikörpern (Abb. 3, Gate F2).

A:

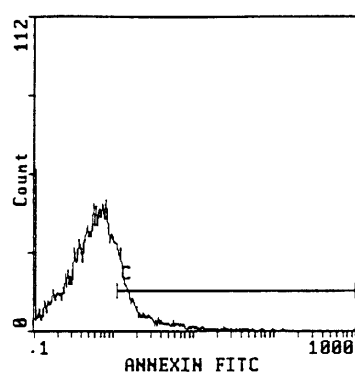


Abb. 1

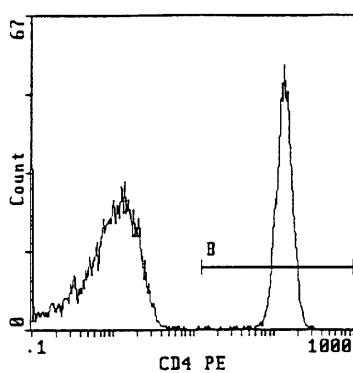


Abb. 2

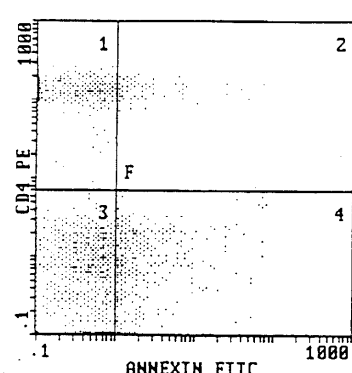


Abb. 3

B:

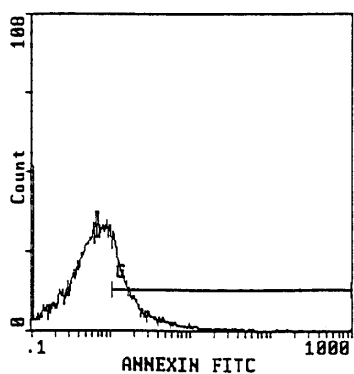


Abb. 1

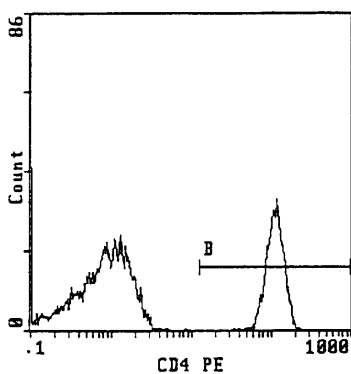


Abb. 2

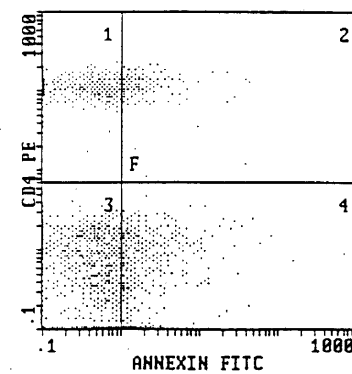


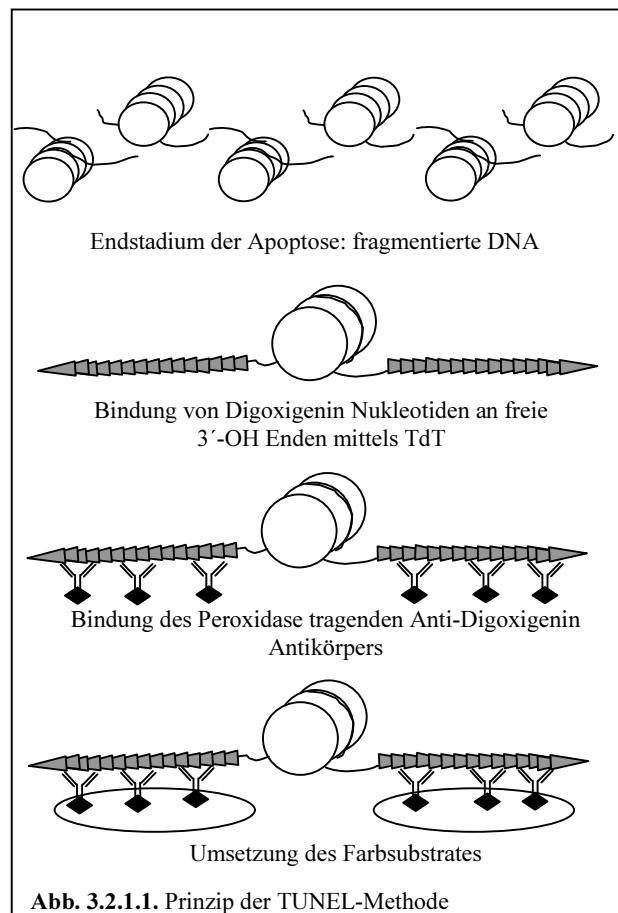
Abb. 3

3.2. Lichtmikroskopische Bestimmung der Apoptose in Lymphknoten

3.2.1. Prinzip der TUNEL-Methode

Das Prinzip der TUNEL-Methode (= Terminale Desoxynucleotidyltransferase-(TdT-) vermitteltes dUTP-Biotin Nick Endlabeling), nach der das ApopTag® In-Situ Apoptosis-Kit arbeitet, basiert auf der spezifischen Bindung von Digoxigenin Nukleotiden an freie 3'-OH Enden der durch die Apoptose fragmentierten DNA (Abb. 3.2.1.1.). Katalysiert wird dieser Schritt durch das Enzym TdT (Terminale Desoxynucleotidyltransferase). Die gebundenen Nukleotide bilden ein zufälliges Heteropolymer aus Digoxigenin-11-dUTP und dATP, welche in der Lage sind, den im nächsten Schritt hinzugegebenen Anti-Digoxigenin Antikörper zu binden. Das Anti-Digoxigenin-Antikörperfragment trägt das konjugierte Peroxidaseenzym, welches im letzten Schritt ein Farbsubstrat umsetzt [109, 122, 150].

Dieses gemischt molekular-biologisch-histochemische System erlaubt eine sensitive und spezifische Anfärbung der sehr hohen Konzentrationen von freien 3'-OH Enden, wie sie bei apoptotisch zerfallenen Zellen auftreten. Das Farbsignal kann leicht mit einem geeigneten Lichtmikroskop bei 400-facher



Vergrößerung erkannt werden, so daß die apoptotischen Zellen ausgezählt werden können.

3.2.2. Verwendete Reagenzien

1. ApopTag[®] In Situ Apoptosis Detection Kit (Oncor)

- enthält: - Ausgleichspuffer
- Reaktionspuffer
- TdT-Enzym
- Stopp-/Waschpuffer
- Anti-Digoxigenin-Peroxidase

2. Destilliertes Wasser (Ampuwa[®], Fresenius)

3. Wasserstoffperoxid (H₂O₂), 2 %

4. Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

50 mM Natriumphosphat, pH 7.2, 200 ml NaCl

5. 0.05 % (w:v) Diaminobenzidin (DAB) in PBS und 0.02 % (v:v) Wasserstoffperoxid

6. Haemalaun nach Mayer (Merck #9249)

7. Xylol absolut (Merck #8681)

8. Ethanol: absolut, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, verdünnt mit destilliertem Wasser

9. Proteinase K, 20 µg/ml in PBS

10. Aquatex Einbettmedium (Merck #8562)

3.2.3. Technische Ausrüstung

1. Lichtmikroskop

2. Brutschrank 37°C (Fa. Heraeus)

3. Pipetten (Fa. Eppendorf)

4. Glasgefäße, Küvetten, Feuchte Kammer

5. Deckplättchen aus Plastik

6. Objektträger (z.B. Super Frost Plus), Deckgläser

7. Filtertrichter, Filterpapier

3.2.4. Verwendetes Material

Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete axilläre oder inguinale Lymphknoten von insgesamt 25 HIV-positiven Patienten in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung, davon 5 Patienten, denen vor und nach 6 Monaten (bei einem Patienten zusätzlich

noch nach 24 Monaten) unter IL-2-Therapie jeweils ein Lymphknoten entnommen wurde.

Lymphknoten gesunder Personen ohne pathologische Veränderungen standen für eine Kontrollgruppe leider nicht zur Verfügung.

3.2.5. Arbeitsschritte

1. Präparation der Lymphknoten und der benötigten Reagenzien

- a. Schnitte von 4-6 µm Dicke werden in einem Wasserbad schwimmend auf Adhäsionsobjektträger (z.B. Super Frost Plus) aufgezogen. Vor der Färbeprozedur werden die Präparate ausreichend lange bei Raumtemperatur für 48 Stunden getrocknet.
- b. Das TdT-Enzym liegt in einer konzentrierten Form in einem Stabilisationspuffer vor und muß vor Gebrauch mit dem Reaktionspuffer verdünnt werden. Das benötigte Verhältnis beträgt 32 µl des TdT-Enzyms verdünnt mit 76 µl Reaktionspuffer. Diese Menge reicht für ca. 10 cm² Präparatfläche aus.
- c. Von dem Stopp-/Waschpuffer wird 1 ml entnommen und mit 34 ml destilliertem Wasser verdünnt.

2. Deparaffinisierung des Lymphknotenschnittes in einem Glasbehälter

- a. Zweimaliges Waschen des Schnittes für jeweils fünf Minuten in Xylol.
- b. Zweimaliges Waschen des Schnittes für jeweils fünf Minuten in absolutem Ethanol.
- c. Waschen des Schnittes in 95 % und 70 % Ethanol, jeweils drei Minuten.
- d. Waschen des Schnittes in PBS für fünf Minuten.

3. Proteinandauung in den Lymphknotenschnitten

- a. Aufträufeln von Proteinase K (20 µg/ml) direkt auf das Präparat. Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur.
- b. Viermaliges Waschen der Präparate in destilliertem Wasser für jeweils zwei Minuten.

4. Unterdrücken der endogenen Peroxidase

- a. Aufträufeln von Wasserstoffperoxid 2 % auf das Präparat, Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur.
- b. Zweimaliges Spülen des Präparates für jeweils fünf Minuten in PBS.

5. Auftragen des Ausgleichspuffers

- a. Überschüssiges PBS abtropfen lassen und Flüssigkeitsreste vorsichtig abtupfen.
- b. Sofort zwei Tropfen des Ausgleichspuffers direkt auf das Präparat geben.
- c. Auflegen eines Plastikdeckplättchens und Inkubation für 30 Sekunden bei Raumtemperatur.

6. Auftragen des vorbereiteten TdT-Enzyms

- a. Abheben des Plastikdeckplättchens und vorsichtiges Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit.
- b. Mit einer Pipette Aufbringen von 54 µl TdT-Enzym auf den Lymphknotenschnitt.
- c. Auflegen eines Plastikdeckplättchens.
- d. Inkubation des Präparates in einer Feuchtigkeitskammer für eine Stunde bei 37°C.

7. Verwenden des Stopp-/Waschpuffers

- a. Abheben des Plastikdeckplättchens.
- b. Inkubation für 15 Minuten in einem mit dem vorbereiteten Stopp-/Waschpuffer gefüllten Gefäß.

8. Auftragen der Anti-Digoxigenin-Peroxidase

- a. Dreimaliges Waschen des Präparates in PBS für jeweils 5 Minuten
- b. Auftragen von 76 µl der Anti-Digoxigenin-Peroxidase auf das Präparat.
- c. Auflegen des Plastikdeckplättchens und Inkubation für 30 Minuten in der Feuchtigkeitskammer bei Raumtemperatur.

9. Waschen in PBS

- a. Abnehmen des Plastikdeckplättchens.
- b. Dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur
- c. Während des Waschvorganges Vorbereiten des 0.05 % DAB.

10. Farbentwicklung

- a. Hinzufügen des Wasserstoffperoxid 2% zu der gefilterten DAB Substratlösung und Aufbringen der Lösung auf das Präparat.
- b. Inkubation für 6 Minuten bei Raumtemperatur.

11. Waschen des Präparates

- a. Dreimaliges Waschen des Lymphknotenschnittes in destilliertem Wasser für jeweils eine Minute.
- b. Waschen des Präparates für 5 Minuten in destilliertem Wasser.

12. Gegenfärbung

- a. Gegenfärbung mit Haemalaun in einem Glasgefäß für eine Minute.
- b. Spülen des Präparates in destilliertem Wasser.

13. Eindecken

- a. Eindecken des Präparates unter einem Deckgläschen mit Hilfe von Einbettmedium.

14. Mikroskopieren

Die angefärbten apoptotischen Zellen können unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden. Bei 400-facher Vergrößerung und mit einem Meßokular wird eine quadratische Fläche von $0,0625 \text{ mm}^2$ erfaßt. 10 zufällig ausgewählte Quadrate werden insgesamt ausgezählt. Die Anzahl der apoptotischen Lymphozyten in jedem der Quadrate wird erfaßt. Die Summe der zehn ausgezählten Felder wird durch 10 dividiert und die durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat ermittelt. Da die Fläche in einem Quadrat $0,0625 \text{ mm}^2$ beträgt, wird durch Multiplikation mit dem Faktor 16 die durchschnittliche Zellzahl für 1 mm^2 berechnet.

3.3. Lichtmikroskopische Bestimmung der Apoptose von Lymphozytensubpopulationen in Lymphknoten

3.3.1. Prinzip der Doppelfärbung mit TUNEL und APAAP

Von den mit der TUNEL-Methode untersuchten Lymphknoten der 25 HIV-positiven Patienten sollten die Lymphknoten der 5 Interleukin-2 erhaltenden Patienten noch näher auf die Frage hin untersucht werden, welche Populationen der T-Lymphozyten unter der IL-2 Therapie apoptotisch zerfallen. Aus diesem Grund wurden die Lymphknoten der fünf IL-2-Patienten zuerst nach der TUNEL-Methode mit obigen Protokoll (Kap. 3.2.) bearbeitet. Nachfolgend wurde eine immunhistochemische Färbung nach der APAAP-Methode, welche die T-Helferzellen (CD4), die T-Suppressorzellen (CD8) und die natürlichen Killerzellen (CD57) darstellt, durchgeführt.

Die Färbeprozedur wurde im ersten Teil exakt nach dem Protokoll der TUNEL-Methode (s. Kapitel 3.2.) durchgeführt. Nach der Färbung mit DAB (Kap. 3.2.5., Punkt 11 des TUNEL-Protokolls) wurde die im folgenden beschriebene APAAP-Methode angewendet. Alle Reagenzien und Materialien, die über das TUNEL-Protokoll hinaus verwendet wurden, sind im folgenden noch gesondert aufgeführt.

3.3.2. Prinzip der APAAP-Methode

Die APAAP (Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase) Technik ist eine sehr gute Methode für Paraffin- oder Gefrierschnitte, um zelluläre Antigene in Geweben, die eine sehr hohe endogene Peroxidaseaktivität aufweisen, zu lokalisieren. Diese Methode wurde zum erstenmal 1984 von Cordell et al. publiziert [25]. Es handelt sich um eine Antikörper-Brücken-Technik für monoklonale Antikörper (siehe Abbildung 3.5.1.1. auf der Seite 46). Der monoklonale dritte Antikörper, der gegen die intestinale alkalische Phosphatase vom Kalb gerichtet ist (APAAP-Komplex), wird über einen polyklonalen Brückenantikörper (Kaninchen-anti-Maus) an den monoklonalen Primärantikörper der Maus gebunden [64, 101, 119]. Als Primärantikörper werden hier die T-Zell-Marker CD4 (T-Helferzelle), CD8 (T-Suppressorzelle) und CD57 (natürliche Killerzelle) verwendet. Als Substrat der Alkalischen Phosphatase wird ein Naphtholsalz und Neufuchsin als chromogene

Substanz hinzugefügt. Die endogene Aktivität der nichtintestinalen Alkalischen Phosphatase kann durch Levamisol gehemmt werden, ohne die Reaktivität der intestinalen Form zu beeinträchtigen oder labile Antikörper zu zerstören [25, 119]. Die hier durchgeführte immunhistologische Doppelmarkierung ermöglicht sowohl die Beurteilung des quantitativen Verhältnisses als auch die Beurteilung der räumlichen Beziehung zweier markierter Antigene innerhalb eines Schnittpräparates.

3.3.3. Verwendete Reagenzien

Neben dem Protokoll der TUNEL-Methode werden folgende Reagenzien benötigt:

1. **TBS** (Tris-gepufferte-Kochsalzlösung):

als Grundlage aller Arbeitslösungen

bestehend aus: 43.9 g NaCl (Serva #A30183)
34.25 g Tris-HCl (Sigma #T3253)
4.0 g Tris-Base (Sigma #T1503)

in Aqua dest. auflösen, pH 7.4 – 7.6 einstellen (mit 1N HCl), auf 5 Liter mit Aqua dest. auffüllen.

2. **RPMI-Medium:**

zum Verdünnen von APAAP-Komplex und Humanserum

bestehend aus: 50 ml RPMI-1640 (Gibco #041-01870H)
450 ml Aqua bidest.
50 ml inaktiviertes Rinderserum
0.5 g Natriumazid

pH-Wert von 7.4 – 7.5 einstellen, vor Gebrauch überprüfen.

3. **BSA 1%:**

zum Verdünnen der Primärantikörper

bestehend aus: 1g BSA (Bovines-Serum-Albumin, Boehringer # ORHD20/21)
in 100 ml TBS auflösen, evtl. 0.1%-iges Natriumazid addieren.

4. **Human-Serum-Medium:**

zum Verdünnen des Brücken-Antikörpers

bestehend aus: 1 Teil inaktiviertes Humanserum (30 min. bei 56°C)
+ 7 Teile RPMI-Medium

5. Neufuchsin-Substratlösung:

Lösung A: -Entwicklungspuffer 58.3 ml bestehend aus: Tris-HCl 1.5 g
Tris-Base 4.9 g
NaCl 8.8 g
ad 1000 ml Aqua dest.

-Propandiol (2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol)
20.8 ml, 21 g auf 1 Liter Aqua dest. (Merck #801464)

-Levamisol 33 mg (Sigma #L9756)

Lösung B: -Naphthol-As-Bi-Phosphat 42 mg (Sigma #N2250)
-N, N-Dimethylformamid 500 µl (Fluka #40250)

Lösung C: Natrium-Nitrit 17 mg (Fluka #71759)
Aqua dest. 417 µl
5%-ige Neufuchsin-Stammlösung 167 µl
[5g Neufuchsin (Serva #30293) in 100 ml 2 N HCl]

Herstellung der Neufuchsin-Substratlösung:

- Einzellösungen in Reihenfolge A, B, C ansetzen.
- Lösung C zu Lösung A geben, mischen.
- Lösung B hinzufügen, mischen.
- pH-Wert 8.7 einstellen, 2 min. reagieren lassen, filtrieren.

6. Citratpuffer pH 6.0, 10 mM:

bestehend aus: Lösung A: 0.1 M Zitronensäure (2.101g/100 ml Aqua dest.)
Lösung B: 0.1 M Natriumcitrat (14.705g/500 ml Aqua dest.)
Zusammensetzung: 4.5 ml Lösung A und 20.5 ml Lösung B zu 225 ml Aqua dest.
gießen und mischen.

7. Primärantikörper:

CD4 (Novocastra #116009, NCL-CD4-1F6), Verdünnung 1:20
CD8 (DAKO #M7103), Verdünnung 1:200
CD57 (Becton Dickinson #347390), Verdünnung 1:5

8. Brückenantikörper (Kaninchen-anti-Maus IgG, DAKO #Z259), Verdünnung 1:40

9. APAAP-Komplex (Monoklonaler Maus IgG₁-Antikörper, DAKO #D0651)
Verdünnung 1:80

3.3.4. Technische Ausrüstung

Neben dem Protokoll der TUNEL-Methode werden folgende Materialien benötigt:

1. Mikrowelle
2. pH-Meter
3. PapPen

3.3.5. Verwendetes Material

Formalinfixierte, in Paraffin eingebettete axilläre oder inguinale Lymphknoten von 5 HIV-positiven Patienten, jeweils vor und nach 6 Monaten (bei einem Patienten noch zusätzlich nach 24 Monaten) unter IL-2 Therapie.

Lymphknoten gesunder Personen, ohne pathologische Veränderungen der Lymphknoten standen für eine Kontrollgruppe leider nicht zur Verfügung.

3.3.6. Arbeitsschritte

1. TUNEL-Methode

Die Arbeitsschritte wurden nach dem TUNEL-Protokoll (Kap. 3.2.5.) durchgeführt. Nach Punkt 11 des Protokolls (DAB Färbung und Waschvorgang) wurde wie folgt fortgefahren:

2. Mikrowellenvorbehandlung

Zur Demaskierung der Antigene werden die Präparate zunächst in Aqua dest. gespült, dann im Citratpuffer pH 6.0 bei 850 Watt in der Mikrowelle aufgeköcht. Sofort auf 350 Watt herunterschalten und 2x5 min. kochen. Zwischendurch den Flüssigkeitsspiegel überprüfen und gegebenenfalls mit Aqua dest. auffüllen. Nach dem Kochvorgang die Schnitte im Citratpuffer bei Raumtemperatur für 20 min. abkühlen lassen, in Aqua dest. spülen. Anschließend 3x in TBS spülen.

3. Inkubation für APAAP mit Primärantikörpern

Die Primärantikörper entsprechend mit BSA 1% verdünnen.

- a. Überschüssige Flüssigkeit um den Schnitt herum abwischen, Schnitt mit PapPen umkreisen, Primärantikörper luftblasenfrei auftragen.
- b. Präparate in einer feuchten Kammer über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend die Schnitte dreimal in TBS spülen und 5 min. darin stehen lassen.

- c. Den Brückenantikörper mit Human-Serum-Medium 1:40 verdünnen.
- d. Brückenantikörper auf die Präparate auftragen und 30 min. in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend die Schnitte dreimal in TBS spülen und 5 min. darin stehen lassen.
- e. APAAP-Komplex 1:80 mit RPMI-Medium verdünnen.
- f. APAAP-Komplex auf die Präparate auftragen und 30 min. in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend die Schnitte dreimal in TBS spülen und 5 min. darin stehen lassen.
- g. Zur Signalverstärkung bei dem Antikörper CD4 und CD57 wird der Brückenantikörper und der APAAP-Komplex im Anschluß nochmals jeweils für 10 min. inkubiert.
- h. Die Präparate in der vorbereiteten Neufuchsinlösung für 30 min. bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend dreimal in TBS spülen.
- i. Mayer's Haemalaun filtrieren und die Schnitte sofort 30 sec. gegenfärben; gut mit Leitungswasser spülen bis keine Farbwolken mehr abgehen und anschließend 5 min. in TBS stehen lassen.
- j. Spülen mit Aqua dest. und anschließendes Eindecken der Präparate mit wäßrigem Einbettmedium (Aquatex).

4. Auswertung

Die apoptotischen Zellen haben durch das DAB eine braune Färbung erhalten, die CD4, CD8, CD57 Lymphozyten sind an der Membran rot angefärbt. Doppeltmarkierte Zellen (z.B. apoptotische CD4-Zellen) sind also im Kern braun und an der Membran rot angefärbt. Die doppeltmarkierten Lymphozyten können unter dem Lichtmikroskop unter 400-facher Vergrößerung mit einem Meßokular pro Flächeneinheit ausgezählt werden. Zur Methode des Auszählens siehe Kap. 3.2.5., Punkt 14.

3.4. Durchflußzytometrische Bestimmung der Proliferation in Blutlymphozyten

3.4.1. Prinzip der MIB-1 Reaktion

Der monoklonale Antikörper MIB-1 weist das nukleäre, zellproliferationsassoziierte Antigen Ki-67 nach, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G_1 -, S-, G_2 -, M-Phasen) exprimiert wird. In ruhenden (G_0 -) Zellen ist das Ki-67 Antigen nicht meßbar. Der verwendete Antikörper MIB-1 entspricht dem, der auch für die immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte verwendet wurde (siehe Kap. 3.5.1.), liegt jedoch schon als FITC (Fluorescein Isothiocyanat) -markierter Antikörper für die Durchflußzytometrie vor [17, 61, 121].

Zur Unterscheidung, welche Zellen des Immunsystems proliferieren, werden rot fluoreszierende (mit R-Phycoerythrin (=PE) konjugierte) monoklonale Antikörper zur Darstellung der lymphozytären Antigene nach der Cluster Definition (CD) eingesetzt. Zur Anwendung kommen hier die Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD4 (T-Helferzellen), CD8 (T-Suppressorzellen) und CD56 (natürliche Killerzellen).

3.4.2. Verwendete Reagenzien

1. **MIB-1-FITC** (DIA 616F Kit, Fa. Dianova):

- monoklonaler IgG₁ Maus Antikörper gegen das Ki-67 Epitop.
- Verdünnung für die Durchflußzytometrie 20 µl für 1×10^6 Zellen.
- Das Kit enthält 2 ml durch Protein-A gereinigten FITC-konjugierten Antikörper in PBS mit BSA 2% und 0.1%-igen Azid.

2. „Fix and Perm Permeabilisation Kit“, Reagenzien A und B (Fa. An Der Grub Bio Research GmbH, Kat. Nr.:GAS-002):

bestehend aus:

- Reagenz A (**Fixationsmedium**), 4 x 5 ml
- Reagenz B (**Permeabilisationsmedium**), 4 x 5 ml

Die Zellsuspension wird zuerst mit Reagenz A fixiert und dann mit Reagenz B permeabilisiert. Diese Prozedur verschafft dem MIB-1-Antikörper den Zugang zu den intrazellulären Strukturen, wobei die Morphologie der Zelle intakt bleibt. Die Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien reduziert die Hintergrundfärbung

und erlaubt die gleichzeitige Anwendung von Permeabilisationsmedium mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern.

3. Antikörper

- Monoklonaler CD4 Antikörper, PE konjugiert (Fa. Coulter #0449)
- Monoklonaler CD8 Antikörper, PE konjugiert (Fa. Coulter #0452)
- Monoklonaler CD56 Antikörper, PE konjugiert (Fa. Coulter #1324)
- Alle Antikörper liegen in flüssiger Form (2 ml) vor und sind mit 2 mg/ml Kälberserum in PBS und Natriumazid 0.1% gepuffert.

4. Ficoll-Paque (Pharmacia)

5. Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS): 50 mM Natrium Phosphat, pH 7.2, 200 ml NaCl)

6. Methanol, 100%

3.4.3. Technische Ausrüstung

- Zentrifuge (Sigma 3 K 18)
- Durchflußzytometer: Coulter EPICS®XL 3 Color FACS.
- Pipetten (Fa. Eppendorf)
- 5 ml und 15 ml Röhrchen, Serumentrenner

3.4.4. Verwendetes Material

Aus Vollblut isolierte Lymphozyten von insgesamt 11 HIV-positiven Patienten zu den Zeitpunkten vor Beginn des IL-2 Zyklus (Tag 0) und an den Tagen 3, 7, 14 nach Beginn des IL-2 Zyklus (jeweils 3. oder 4. Zyklus).

3.4.5. Arbeitsschritte

1. Blutentnahme

Es wurden jeweils 2 x 10 ml EDTA-Blut durch Venenpunktion entnommen.

2. Zellisolation

- a. Abzentrifugieren des Vollblutes in den EDTA-Röhrchen bei 900 g.
- b. Verwerfen des Serumüberstandes.
- c. Verdünnen der verbliebenen zellulären Bestandteile des Blutes mit 3 ml PBS je EDTA-Röhrchen.

- d. Überschichten eines Ficoll Gradienten mit dem verdünnten Blut und 15-minütige Zentrifugation bei 900 g.
- e. Absaugen der Interphase und dreimaliges Waschen mit PBS. Die gewonnenen Zellen werden je Probenröhrchen auf eine Zellzahl von 0.5×10^6 Zellen/100 μ l eingestellt.

3. Zellpräparation

- a. Füllen eines 15 ml Röhrchens mit 100 μ l der Reagenz A (Fixationsmedium) bei Raumtemperatur.
- b. Hinzugeben von 100 μ l der separierten Lymphozyten zu Reagenz A.
- c. Inkubation für 3 min. bei Raumtemperatur.
- d. Hinzugeben von vorgekühltem absolutem Methanol (4°C), Schütteln.
- e. Inkubation im Kühlschrank (4°C) für 10 min.
- f. Abzentrifugieren für 5 min. bei 300 g und Waschen mit PBS.
- g. Verwerfen des Überstandes und Hinzufügen von 100 μ l Reagenz B (Permeabilisationsmedium) zu dem Zellpellet und Schütteln für 10 sec.
- h. Hinzugabe von 20 μ l FITC-markiertem MIB-1-Antikörper und 20 μ l des entsprechenden Oberflächenmarkers (CD4, CD8, CD56), Schütteln.
- i. Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- j. Waschen der Zellen in PBS und sofortige Analyse der Proben im Durchflußzytometer.

4. Analyse im Durchflußzytometer

Für jede Probe wurden 10000 bis 80000 Lymphozyten nach Größe („Forward Scatter“, FSC) und Granularität („Side Scatter“, SSC) im Durchflußzytometer eingegrenzt und mit entsprechender Software analysiert. Durch Verwendung von grünen und roten Fluoreszenzfarbstoffen wurde die Unterscheidung von einfachmarkierten und doppeltmarkierten Zellen ermöglicht. Zur individuellen Einstellung der exakten Grenzen zwischen markierten und unmarkierten Zellen wurde von jedem Patienten eine Negativkontrolle ohne angefärbte Zellen mitgeführt und im Durchflußzytometer analysiert, bevor die eigentliche Messung durchgeführt wurde.

5. Ausdruck der Durchflußzytometeranalyse

Beispielhaft zeigt die obere Spalte (Reihe A) die Probe vor, die untere Spalte (Reihe B) die Probe 7 Tage nach Beginn des IL-2-Zyklus. Dargestellt sind die Einfachmarkierungen mit dem MIB-1 Antikörper (Abb. 1, Gate C) und mit dem CD4 Antikörper (Abb. 2, Gate B), sowie die Doppelmarkierung mit beiden Antikörpern (Abb. 3, Gate F2).

A:

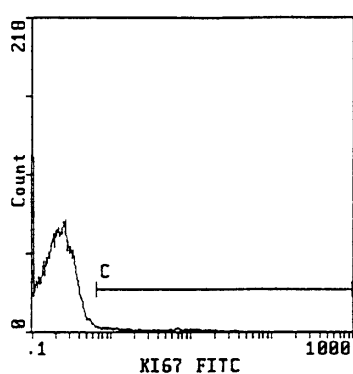


Abb. 1

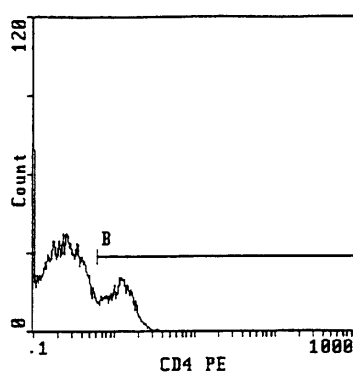


Abb. 2

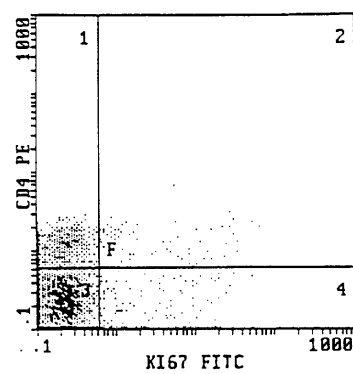


Abb. 3

B:

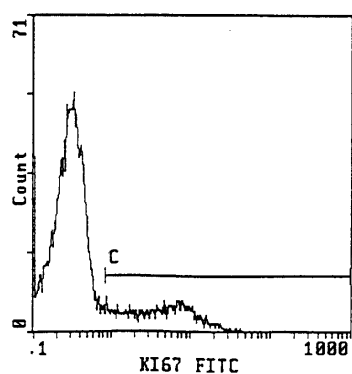


Abb. 1

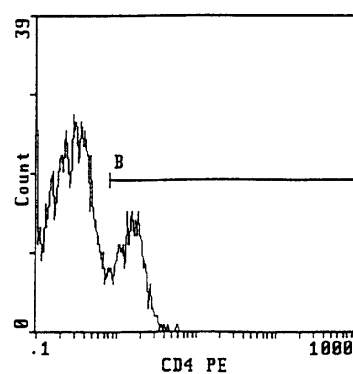


Abb. 2

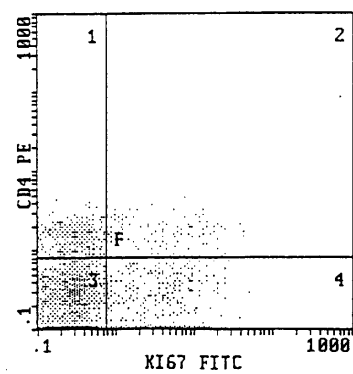


Abb. 3

3.5. Lichtmikroskopische Bestimmung der Proliferation von Lymphozytensubpopulationen in Lymphknoten

3.5.1. Prinzip der APAAP-Methode und der MIB-1-Reaktion

Die APAAP (Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase)-Technik ist eine sehr gute Methode für Paraffin- oder Gefrierschnitte, um zelluläre Antigene in Geweben zu lokalisieren, die eine sehr hohe endogene Peroxidaseaktivität aufweisen. Diese Methode wurde zum erstenmal 1984 von Cordell et al. publiziert [25]. Es handelt sich um eine Antikörper-Brücken Technik für monoklonale Antikörper. Der monoklonale dritte Antikörper, der gegen die intestinale alkalische Phosphatase vom Kalb gerichtet ist (APAAP-Komplex), wird über einen polyklonalen Brückenantikörper (Kaninchen-anti-Maus) an den monoklonalen Primärantikörper der Maus gebunden (Abb. 3.5.1.1.) [64, 101, 119]. Als Primärantikörper wurden hier der Pan-B-Zellmarker CD20 und der Pan-T-Zellmarker CD3 zur besseren Lokalisation der Zellpopulationen verwendet. Zur feineren Differenzierung der Subpopulationen kamen noch die T-Zell-Marker CD4 (Helferzellen), CD8 (Suppressorzellen) und CD57 (natürliche Killerzellen) zur Anwendung, sowie der Marker CD23 (aktivierte B-Zellen und follikulär-dendritische Zellen). Als weiterer Primärantikörper wurde der Proliferationsmarker MIB-1 verwendet. Der monoklonale Antikörper MIB-1 weist das nukleäre, zellproliferationsassoziierte Antigen Ki-67

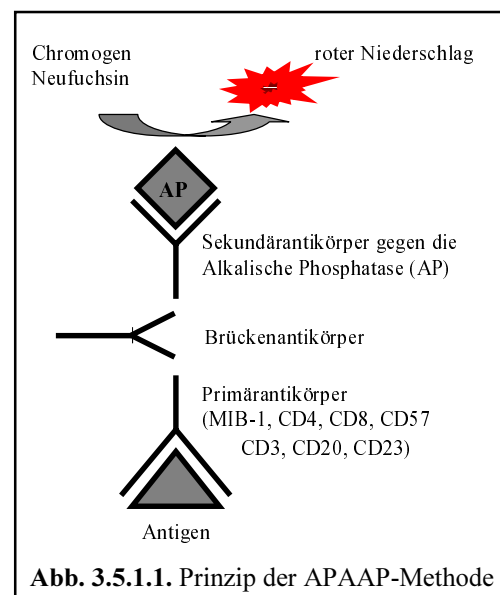


Abb. 3.5.1.1. Prinzip der APAAP-Methode

nach, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G_1 -, S-, G_2 -, M-Phasen) exprimiert wird. In ruhenden (G_0 -) Zellen ist das Ki-67 Antigen nicht nachweisbar. Die Spezifität von MIB-1 für dieses Antigen konnte durch immunhistochemische sowie biochemische und molekularbiologische Techniken gezeigt werden. Auch der Nachweis an routinemäßig hergestellten Paraffinschnitten ist nach Entparaffinisierung und Inkubation in einem Mikrowellengerät möglich. MIB-1 zeigt in proliferierenden Zellen eine starke Kernfärbung. Die Reaktivität des Antikörpers bleibt auch nach

Dekalzifizierungs- und Depigmentierungstechniken mit anschließender Inkubation in der Mikrowelle voll erhalten [17, 61, 121].

Für die Oberflächenmarker CD3, CD20, CD23, CD4, CD8, CD57 wurde als Substrat der Alkalischen Phosphatase ein Naphtholsalz und Neufuchsin als chromogene Substanz hinzugefügt. Die endogene Aktivität der nichtintestinalen Alkalischen Phosphatase kann durch Levamisol gehemmt werden, ohne die Reaktivität der intestinalen Form zu beeinträchtigen oder labile Antikörper zu zerstören [25, 119]. Für den Proliferationsmarker MIB-1 wurde als Substrat der Alkalischen Phosphatase BCIP verwendet, welches nach seiner Dephosphorylierung oxidativ in einen blauen Indigofarbstoff überführt wird. Als Oxidationsmittel dient NBT, welches bei dieser Reaktion ebenfalls zu einem blauen Farbstoff reagiert. NBT wirkt somit farbverstärkend [54]. Die immunhistologische Doppelmarkierung von MIB-1 mit CD4, CD8 und CD57 ermöglicht sowohl die Beurteilung des quantitativen Verhältnisses als auch die Beurteilung der räumlichen Beziehung zweier markierter Antigene innerhalb eines Schnittpräparates. Für eine Doppelmarkierung wurden die nachfolgend vorgestellten Protokolle nacheinander ausgeführt. Das rote (CD-Antikörper) und schwarze Reaktionsprodukt (MIB-1-Antikörper) der APAAP-Technik ist nach einer Gegenfärbung mit Haemalaun sehr kontrastreich und lässt sich auch bei Präparaten mit wenig positiven Markierungen oder geringer Antigendichte leicht lokalisieren.

3.5.2. Verwendete Reagenzien

1. TBS (Tris-gepufferte-Kochsalzlösung):

als Grundlage aller Arbeitslösungen

bestehend aus: 43.9 g NaCl (Serva #A30183)
 34.25 g Tris-HCl (Sigma #T3253)
 4.0 g Tris-Base (Sigma #T1503)

in Aqua dest. auflösen, pH 7.4 – 7.6 einstellen (mit 1N HCl), auf 5 Liter mit Aqua dest. auffüllen.

2. RPMI-Medium:

zum Verdünnen von APAAP-Komplex und Humanserum

bestehend aus: 50 ml RPMI-1640 (Gibco #041-01870H)

450 ml Aqua bidest.

50 ml inaktiviertes Rinderserum

0.5 g Natriumazid

pH-Wert von 7.4 – 7.5 einstellen, vor Gebrauch überprüfen.

3. BSA 1%:

zum Verdünnen der Primärantikörper

bestehend aus: 1g BSA (Bovines-Serum-Albumin, Boehringer # ORHD20/21)

in 100 ml TBS auflösen, evtl. 0.1%-iges Natriumazid addieren

4. Human-Serum-Medium:

zum Verdünnen des Brücken-Antikörpers

bestehend aus: 1 Teil inaktiviertes Humanserum (30 min. bei 56°C)

+ 7 Teile RPMI-Medium

5. Neufuchsin-Substratlösung:

Lösung A: -Entwicklungspuffer 58.3 ml bestehend aus: Tris-HCl 1.5 g

Tris-Base 4.9 g

NaCl 8.8 g

ad 1000 ml Aqua dest.

-Propandiol (2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol)

20.8 ml, 21 g auf 1 Liter Aqua dest. (Merck #801464)

-Levamisol 33 mg (Sigma #L9756)

Lösung B: -Naphthol-As-Bi-Phosphat 42 mg (Sigma #N2250)

-N, N-Dimethylformamid 500 µl (Fluka #40250)

Lösung C: Natrium-Nitrit 17 mg (Fluka #71759)

Aqua dest. 417 µl

5%-ige Neufuchsin-Stammlösung 167 µl

[5g Neufuchsin (Serva #30293) in 100 ml 2 N HCl]

Herstellung der Neufuchsin-Substratlösung:

- Einzellösungen in Reihenfolge A, B, C ansetzen.
- Lösung C zu Lösung A zugeben, mischen
- Lösung B hinzufügen, mischen

- pH-Wert 8.7 einstellen, 2 min. reagieren lassen, filtrieren.
- 6. **NBT/BCIP Stammlösung** (Boehringer Mannheim #1681451)
zur Entwicklung der Alkalischen Phosphatase
kurz vor Gebrauch 200 µl Stammlösung zu 10 ml 0.1M Tris Puffer, pH 9.5,
0.05M MgCl₂, 0.1M NaCl geben
NBT= Nitroblautetrazoliumchlorid
BCIP= 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphatase
- 7. **Citratpuffer** pH 6.0, 10 mM:
bestehend aus: Lösung A: 0.1 M Zitronensäure (2.101g/100 ml Aqua dest.)
 Lösung B: 0.1 M Natriumcitrat (14.705g/500 ml Aqua dest.)
Zusammensetzung: 4.5 ml Lösung A und 20.5 ml Lösung B zu 225 ml Aqua dest.
gießen und mischen.
- 8. **Target-Retrieval-Solution (TRS)**, pH 6.0, 10-fach konzentriert (DAKO #S1699),
vor Gebrauch mit Aqua dest. verdünnen
- 9. **Aquatex Einbettmedium** (Merck #8562)
- 10. **Haemalaun nach Mayer** (Merck #9249)
- 11. **Xylol absolut** (Merck #8681)
- 12. **Isopropanol** (absolut, 95%, 80%, 60%)
- 13. **Primärantikörper:**
CD3 (Coulter #2157), Fertigverdünnung
CD20 (Coulter #1565), Fertigverdünnung
CD23 (Medac #NCL-CD23-1B12), Verdünnung 1:100
CD4 (Novocastra #116009 NCL-CD4-1F6), Verdünnung 1:20
CD8 (DAKO #M7103), Verdünnung 1:200
CD57 (Becton Dickinson #347390), Verdünnung 1:5
MIB-1 (Dianova #dia500), Verdünnung 1:100
- 14. **Brückenantikörper** (Kaninchen-anti-Maus IgG, DAKO #Z259), Verdünnung
1:40
- 15. **APAAP-Komplex** (Monoklonaler Maus IgG₁-Antikörper, DAKO #D0651)
Verdünnung 1:80

3.5.3. Technische Ausrüstung

- | | |
|--|-------------------------------------|
| 1. Lichtmikroskop | 6. Objektträger (Super Frost Plus), |
| 2. Mikrowelle | Deckgläser |
| 3. pH-Meter | 7. Filtertrichter, Filterpapier |
| 4. Feuchte Kammer | 8. Pipetten |
| 5. Glasbehälter, Küvetten, Ständer
für Objektträger | 9. PapPen |

3.5.4. Verwendetes Material

Formalinfixierte, in Paraffin eingebettete axilläre oder inguinale Lymphknoten von 5 HIV-positiven Patienten, jeweils vor und nach 6 Monaten (bei einem Patienten noch zusätzlich nach 24 Monaten) unter IL-2 Therapie.

Lymphknoten gesunder Personen ohne pathologische Veränderungen für eine Kontrollgruppe standen leider nicht zur Verfügung.

3.5.5. Arbeitsschritte

1. Vorbereiten der Paraffinschnitte

- a. Schnitte von 4-6µm Dicke werden in einem Wasserbad schwimmend auf Adhäsionsobjektträger (z.B. Super Frost Plus) aufgezogen. Die Präparate werden bei 37°C über Nacht getrocknet.
- b. Deparaffinisierung der Schnitte in Xylol (2x10 min.)
- c. Hydratisierung der Schnitte in einer absteigenden Isopropanolreihe (jeweils 2 min. in 99%, 80%, 60% Isopropanol), dann 5 min. waschen in TBS.
- d. Mikrowellenvorbehandlung: Zur Demaskierung der Antigene werden die Präparate zunächst in Aqua dest. gespült, dann im Citratpuffer pH 6.0 bei 850 Watt in der Mikrowelle aufgeköcht (für die Präparate, die später mit dem Antikörper CD23 gefärbt werden, wird statt Citratpuffer TRS-Puffer, pH 6.0 zum Kochen verwendet). Sofort auf 350 Watt herunterschalten und 2x5 min. kochen. Zwischendurch den Flüssigkeitsspiegel überprüfen und gegebenenfalls mit Aqua dest. auffüllen. Nach dem Kochvorgang die Schnitte im Citratpuffer bzw. TRS-Puffer) bei Raumtemperatur für 20 min. abkühlen lassen, in Aqua dest. spülen. Anschließend 3x in TBS spülen.

2. Inkubation für APAAP mit MIB-1

- a. Den MIB-1-Antikörper 1:100 mit BSA 1% verdünnen.
- b. Überschüssige Flüssigkeit um den Schnitt herum abwischen, Schnitt mit PapPen umkreisen, Primärantikörper luftblasenfrei auftragen.
- c. Präparate in einer feuchten Kammer für 60 min. bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend die Schnitte dreimal in TBS spülen und 5 min. darin stehen lassen.
- d. Den Brückenantikörper mit Human-Serum-Medium 1:40 verdünnen.
- e. Brückenantikörper auf die Präparate auftragen und 30 min. in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend die Schnitte dreimal in TBS spülen und 5 min. darin stehen lassen.
- f. APAAP-Komplex 1:80 mit RPMI-Medium verdünnen.
- g. APAAP-Komplex auf die Präparate auftragen und 30 min. in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend die Schnitte dreimal in TBS spülen und 5 min. darin stehen lassen.
- h. Vorbereitete NBT-Lösung auf die Schnitte geben und 15 min. in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend die Schnitte dreimal in TBS spülen und 5 min. darin stehen lassen.

3. Inkubation für APAAP mit weiteren Primärantikörpern

- a. Es wird genauso wie unter Punkt 2 a.-g. verfahren. Die Verdünnung der Primärantikörper mit BSA 1% beträgt 1:20 (CD4), 1:200 (CD8), 1:5 (CD57), 1:100 (CD23). Die Antikörper CD3 und CD23 liegen als Fertigverdünnung vor und können direkt verwendet werden. Die Inkubationszeit für die Antikörper CD4, CD8, CD57, CD3, CD20, CD23 beträgt 12 Stunden.
- b. Zur Signalverstärkung bei den Antikörpern CD4 und CD57 wird der Brückenantikörper und der APAAP-Komplex im Anschluß nochmals jeweils für 10 min. inkubiert.
- c. Die Präparate in der vorbereiteten Neufuchsinlösung für 30 min. bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend dreimal in TBS spülen.
- d. Mayer's Haemalaun filtrieren und die Schnitte sofort 30 sec. gegenfärben; gut mit Leitungswasser spülen bis keine Farbwolken mehr abgehen und anschließend 5 min. in TBS stehen lassen.

- e. Spülen mit Aqua dest. und anschließendes Eindecken der Präparate mit wäßrigem Einbettmedium (Aquatex).

4. Auswertung

Die proliferierenden Zellen haben durch das NBT eine schwarze Kernfärbung erhalten, die CD4, CD8, CD57, CD3, CD20, CD23 Lymphozyten sind an der Membran rot angefärbt. Doppeltmarkierte Zellen (z.B. proliferierende CD4-, CD8-, CD57-Zellen) sind also im Kern schwarz und an der Membran rot angefärbt. Einfachmarkierte Zellen haben nur eine rote Membranfärbung erhalten. Die einfach und doppeltmarkierten Lymphozyten können unter dem Lichtmikroskop unter 400-facher Vergrößerung mit einem Meßokular pro Flächeneinheit ausgezählt werden. Zur genauen Methodik der Auswertung siehe Kapitel 3.2.5. unter Punkt 14.

3.6. Statistische Berechnung

3.6.1. Berechnung des Korrelationskoeffizienten (r)

Hierbei wird der Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen gemessen, die skaliert werden, um unabhängig von den jeweiligen Maßeinheiten zu sein. Die Korrelation der Grundgesamtheit ergibt sich aus der Kovarianz zweier Datensätze, dividiert durch das Produkt aus deren Standardabweichungen. Hiermit wird untersucht, ob sich zwei Meßreihen gleich entwickeln, d.h. ob hohe Werte des einen Datensatzes mit hohen Werten des anderen zusammenhängen (positive Korrelation), ob niedrige Werte des einen Datensatzes mit hohen Werten des anderen zusammenhängen (negative Korrelation) oder ob zwischen den Werten der beiden Datensätze kein Zusammenhang besteht.

3.6.2. Berechnung des arithmetischen Mittelwertes (\bar{x})

Der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) errechnet sich aus der Summe aller Werte dividiert durch die Anzahl aller Werte.

3.6.3. Berechnung der Standardabweichung (\pm)

Entspricht der Quadratwurzel der Varianz (Varianz: durchschnittliches Abweichungsquadrat = Summe aller Abweichungsquadrate dividiert durch die Zahl aller Meßwerte minus 1).

4. Ergebnisse

4.1. Patientencharakteristika

4.1.1. Apoptose von Lymphozyten im peripheren Blut bei HIV-Patienten

4.1.1.1. Tabelle der Meßergebnisse und Patientenbasisdaten

Die folgende Tabelle listet systematisch die Patientenbasisdaten und die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchungen zur Apoptose im peripheren Blut derjenigen HIV-Patienten auf, welche eine ART ohne IL-2 erhielten.

<i>Patient</i>	<i>Erst-Diagnose</i>	<i>Stadium CDC</i>	<i>CD4-Zellen/μl</i>	<i>CD8-Zellen/μl</i>	<i>CD4/CD8 Quotient</i>	<i>Viruslast im Blut Eq/ml</i>	<i>Annexin-positive Zellen (%)</i>
1	1991	C3	26	208	0,1	284000	33,0
2	1994	C3	74	462	0,2	*	21,7
3	1992	C3	11	393	0	110200	14,2
4	1988	B2	352	1234	0,3	43680	24,8
5	1991	C3	107	342	0,3	3941	36,6
6	1997	A1	1439	1090	1,3	< 500	4,0
7	1992	C3	109	704	0,2	4769	24,5
8	1985	C3	84	1011	0,1	10910	12,7
9	1992	C3	54	169	0,3	6133	6,4
10	1992	C3	189	1237	0,2	*	30,4
11	1991	B3	234	905	0,3	*	25,7
12	1993	B2	413	1192	0,3	11270	13,0
13	1995	B2	393	794	0,5	93860	16,8
14	1986	B2	334	1950	0,2	20650	15,0
15	1987	C3	23	48	0,5	16980	13,0
16	1992	C3	11	217	0	97820	17,3
17	1989	C3	267	591	0,5	1986	34,5
18	1992	B2	402	1144	0,4	37780	32,8
19	1996	C3	186	703	0,3	1175	19,0
20	1994	A2	432	1258	0,3	< 500	14,4

Fortsetzung Tabelle 4.1.1.1.

<i>Patient</i>	<i>Erst-Diagnose</i>	<i>Stadium CDC</i>	<i>CD4-Zellen/μl</i>	<i>CD8-Zellen/μl</i>	<i>CD4/CD8 Quotient</i>	<i>Viruslast Eq/ml</i>	<i>Annexin-positive Zellen (%)</i>
21	1986	B2	342	1927	0,2	160200	20,8
22	1987	B2	418	1319	0,3	3597	14,9
23	1991	C3	74	256	0,3	42940	41,9
24	1996	B3	687	1037	0,7	98860	11,4
25	1996	B1	593	1795	0,3	22980	13,9
26	1995	C3	243	1210	0,2	60200	24,2
27	1997	C3	117	1287	0,1	13650	37,7
28	1992	C3	275	1207	0,2	6968	27,6
29	1997	A1	1575	1181	1,3	842	8,1

Tabelle 4.1.1.1.

Die Tabelle 4.1.1.1. zeigt die Daten der 29 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne IL-2 erhielten. Die Daten entsprechen den Werten zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die Stadieneinteilung erfolgte nach der CDC-Klassifikation der WHO von 1993 [18]. CD4-Zellen und CD8-Zellen wurden durch ein zelluläres Immunogramm bestimmt, die Maßeinheit entspricht Zellen/ μ l. Die Viruslast wurde mit Hilfe der „branched-chain“-DNA-Methode (b-DNA) bestimmt, die Maßeinheit ist das Virusäquivalent (Eq/ml), wobei zwei RNA-Stränge einem HI-Virus entsprechen. Bei den mit (*) gekennzeichneten Spalten lagen keine dem Zeitpunkt der Blutabnahme entsprechenden Ergebnisse vor. Die apoptotischen Lymphozyten wurden durchflußzytometrisch mit Hilfe des Apoptosefrühmarkers Annexin bestimmt. Die Werte liegen als prozentualer Anteil der Annexin-positiven (=apoptotischen) Lymphozyten zur Gesamtlymphozytenzahl vor. Die durchschnittliche Apoptoserate der 29 Patienten lag in den beiden klinischen CDC-Kategorien A (asymptomatisches Stadium) und B (symptomatische Patienten ohne AIDS) bei \bar{O} 8,8% (\pm 5,2) bzw. bei \bar{O} 18,9% (\pm 6,9). In der klinischen Kategorie C (symptomatische Patienten mit AIDS) lag die Apoptoserate bei \bar{O} 24,6% (\pm 10,4). Neben den HIV-positiven Patienten wurden 3 gesunde Probanden untersucht. Die Apoptoserate betrug hier 5,4%, 4,1% und 9,4% (\bar{O} 6,3%, \pm 2,7%).

4.1.2. Einfluß von IL-2 auf Apoptose und Proliferation von Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut bei HIV-Patienten

4.1.2.1. Tabelle der Meßergebnisse

Die folgende Tabelle listet systematisch alle durchflußzytometrischen Meßergebnisse der 13 Patienten auf, deren Blut vor und während des 3. bzw. 4. IL-2 Zyklus untersucht wurde.

	<i>Apoptose</i>					<i>Proliferation</i>				<i>Kinetik der Lymphozyten- subpopulationen</i>		
<i>Patient</i>	<i>Tag unter IL-2 Therapie</i>	<i>Annexin+ Lymphozyten %</i>	<i>Annexin+CD4+ Lymphozyten %</i>	<i>Annexin+CD8+ Lymphozyten %</i>	<i>Annexin+CD56+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+CD4+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+CD8+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+CD56+ Lymphozyten %</i>	<i>CD4+ Lymphozyten %</i>	<i>CD8+ Lymphozyten %</i>	<i>CD56+ Lymphozyten %</i>
1 MAN	0	17,4	22,3	10,1	26,1	2,4	2,4	2,4	7,8	47,4	37,1	17,8
	3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	7	20,4	24,1	28,2	27,2	24,9	25,3	29,0	58,2	62,2	28,4	12,3
	14	18,0	16,4	17,2	24,9	6,3	4,5	11,9	14,9	51,9	36,6	16,4
2 FIG	0	17,6	16,2	17,4	25,2	5,3	9,6	8,5	13,7	27,2	59,7	17,7
	3	23,2	20,0	21,9	32,9	11,3	19,2	23,0	50,6	26,5	57,4	17,0
	7	27,5	24,7	35,6	37,0	23,6	29,2	30,7	59,6	28,2	61,5	11,1
	14	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3 PUR	0	25,3	26,8	23,2	31,6	13,1	16,7	21,1	30,4	9,3	46,3	8,5
	3	27,7	31,3	32,0	29,8	20,3	38,8	31,3	60,0	11,7	48,6	9,9
	7	30,9	35,6	36,6	33,2	32,5	50,7	66,6	58,2	11,2	55,1	12,7
	14	25,3	22,0	24,9	30,4	10,0	23,6	46,4	33,7	10,1	53,2	11,0
4 CZM	0	24,0	28,5	25,5	37,5	5,5	10,1	9,4	13,5	8,6	73,3	8,1
	3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	7	30,5	32,6	25,6	37,9	20,1	62,1	25,2	49,9	9,9	69,7	12,4
	14	24,7	29,7	23,8	27,3	9,0	26,4	17,3	22,7	10,2	66,9	10,4
5 ZIT	0	21,6	21,1	24,2	23,3	7,6	12,1	10,8	39,6	21,8	52	8,1
	3	25,2	31,6	28,3	31,3	12,7	22,4	13,1	38,5	18,9	42,7	8,8
	7	30,4	35,9	34,6	42,5	14,6	26,6	22,1	18,5	23,1	43,2	8,1
	14	22,6	22,6	24,5	26,3	8,3	12,8	11,0	26,2	23,7	55,5	11,8

Fortsetzung Tabelle 4.1.2.1.

<i>Patient</i>	<i>Apoptose</i>					<i>Proliferation</i>				<i>Kinetik der Lymphozyten- subpopulationen</i>		
	<i>Tag unter IL-2 Therapie</i>	<i>Annexin+ Lymphozyten %</i>	<i>Annexin+CD4+ Lymphozyten %</i>	<i>Annexin+CD8+ Lymphozyten %</i>	<i>Annexin+CD56+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+CD4+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+CD8+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+CD56+ Lymphozyten %</i>	<i>CD4+ Lymphozyten %</i>	<i>CD8+ Lymphozyten %</i>	<i>CD56+ Lymphozyten %</i>
6 KOS	0	20,3	14,1	31,0	20,0	5,3	8,8	5,6	21,5	29,5	52,1	9,8
	3	31,5	26,4	42,9	36,8	12,6	19,9	12,1	28,0	29,1	42,2	10,5
	7	34,1	39,1	36,1	27,0	38,0	68,6	47,8	69,4	33,1	42,3	21,4
	14	22,1	15,2	32,6	21,7	5,6	9,5	8,6	24,9	34,0	44,5	15,5
7 MER	0	18,6	21,7	20,5	34,3	5,8	3,9	6,2	12,7	4,3	66,7	9,2
	3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	7	31,3	36,8	28,6	32,9	7,9	52,4	30,8	27,0	5,0	71,6	8,3
	14	18,8	23,8	19,7	30,8	4,4	25,5	7,2	15,0	5,9	80,7	8,7
8 LUS	0	19,6	15,9	23,2	27,9	6,8	12,2	6,6	28,0	19,0	65,9	5,9
	3	26,0	21,8	31,9	37,4	9,0	18,7	10,6	40,6	15,5	64,9	9,7
	7	29,0	27,3	31,9	27,1	21,0	27,3	16,3	70,8	20,1	54,4	13,9
	14	20,9	17,0	23,7	27,1	7,9	16,0	6,6	24,2	25,7	55,7	8,0
9 SCH	0	16,1	16,0	21,6	31,1	4,4	*	*	*	32,7	40,1	19,7
	3	27,5	20,4	34,5	34,9	5,0	6,5	6,5	*	31,8	38,3	16
	7	29,9	26,2	35,5	33,5	13,1	13,8	11,8	43,5	34,4	41	25,6
	14	19,0	20,8	24,7	24,6	5,5	11,0	6,2	21,8	30,1	45,6	24,3
10 SCJ	0	18,3	25,3	33,0	32,4	8,3	8,3	9,3	19,5	10,5	39,1	2,1
	3	25,7	42,8	38,5	34,7	20	34,2	23,6	69,6	10,7	28,5	10,1
	7	21,0	36,0	37,8	28,6	48,2	40,8	67,4	39,0	6,4	40,5	1,2
	14	18,5	23,5	26,6	36,1	7,6	7,1	11,8	15,2	11,7	30,4	2,3

Fortsetzung Tabelle 4.1.2.1.

	<i>Apoptose</i>					<i>Proliferation</i>				<i>Kinetik der Lymphozyten- subpopulationen</i>		
<i>Patient</i>	<i>Tag unter IL-2 Therapie</i>	<i>Annexin+ Lymphozyten %</i>	<i>Annexin+CD4+ Lymphozyten %</i>	<i>Annexin+CD8+ Lymphozyten %</i>	<i>Annexin+CD56+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+CD4+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+CD8+ Lymphozyten %</i>	<i>MIB-1+CD56+ Lymphozyten %</i>	<i>CD4+ Lymphozyten %</i>	<i>CD8+ Lymphozyten %</i>	<i>CD56+ Lymphozyten %</i>
11 GEM	0	16,7	13,0	23,8	34,4	6,0	8,8	5,0	35,4	31,9	54,3	5,3
	3	19,9	25,7	14,3	15,9	*	*	*	*	*	*	*
	7	21,3	25,6	35,8	16,2	13,4	34,7	10,6	52,9	26,4	57,8	6,2
	14	17,8	17,5	21,9	19,1	6,7	9,6	9,3	33,9	29,5	55,3	5,8
12 PEM	0	20,0	26,5	22,5	18,6	*	*	*	*	13,3	41,7	24,2
	3	26,1	32,8	25,0	33,3	*	*	*	*	11,8	32,5	27,0
	7	21,1	24,2	30,4	23,1	*	*	*	*	14,0	35,5	28,9
	14	20,5	29,0	26,4	23,5	*	*	*	*	13,3	41,7	27,6
13 WAD	0	21,1	20,3	21,9	24,2	*	*	*	*	5,4	85,6	30,0
	3	39,0	37,5	42,5	44,6	*	*	*	*	8,5	65,5	20,6
	7	24,6	24,3	24,7	28,2	*	*	*	*	13,8	77,5	12,0
	14	22,5	25,4	21,3	33,8	*	*	*	*	4,7	78,9	20,9
Gesamtpatienten	0	Ø 19,7 ± 2,7	Ø 20,6 ± 5,2	Ø 22,9 ± 5,4	Ø 26,6 ± 6,6	Ø 6,4 ± 2,7	Ø 9,3 ± 4,1	Ø 8,5 ± 5,1	Ø 22,2 ± 10,7	Ø 19,4 ± 12,6	Ø 55,1 ± 14,7	Ø 12,7 ± 8,4
	3	Ø 27,2 ± 5,1	Ø 29,0 ± 7,5	Ø 31,2 ± 9,1	Ø 33,1 ± 7,3	Ø 13,0 ± 5,5	Ø 22,8 ± 10,7	Ø 17,2 ± 8,9	Ø 47,9 ± 15,2	Ø 18,3 ± 8,2	Ø 45,6 ± 13,1	Ø 13,1 ± 7,2
	7	Ø 27,0 ± 4,7	Ø 30,2 ± 5,8	Ø 32,4 ± 4,4	Ø 30,3 ± 6,8	Ø 23,4 ± 12,0	Ø 39,2 ± 18,0	Ø 32,6 ± 19,9	Ø 46,0 ± 21,8	Ø 22,5 ± 15,6	Ø 51,6 ± 15,0	Ø 13,2 ± 7,9
	14	Ø 20,9 ± 2,5	Ø 21,9 ± 4,7	Ø 23,9 ± 3,8	Ø 27,1 ± 4,9	Ø 7,1 ± 1,7	Ø 14,6 ± 7,9	Ø 17,4 ± 14,4	Ø 23,2 ± 7,0	Ø 20,1 ± 14,5	Ø 53,2 ± 15,6	Ø 13,4 ± 7,8

Tabelle 4.1.2.1.

Die Tabelle 4.1.2.1. zeigt die Meßergebnisse der 13 (Apoptosemessung) bzw. 11 (Proliferationsmessung) HIV-positiven Patienten, deren Blut während des dritten oder vierten IL-2 Zyklus zu den Tagen vor Beginn des Zyklus (Tag 0), Tag 3, Tag 7 und Tag 14 (subkutane IL-2 Injektionen an den Tagen 1 bis 5) auf Apoptose und Proliferation der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen mit Hilfe des Durchflußzytometers untersucht wurden. Gezeigt wird die apoptotische bzw.

proliferierende Gesamtlymphozytenzahl (prozentualer Anteil der mit Annexin oder MIB-1 markierten Lymphozyten an der gemessenen Gesamtlymphozytenzahl). Weiter aufgeführt ist der prozentuale Anteil der doppeltmarkierten Zellen (MIB-1 bzw. Annexin + CD-Oberflächenmarker) an der Annexin- bzw. MIB-1-positiven Gesamtlymphozytenzahl. Ebenfalls ist die relative Anzahl der mit dem CD-Antikörper einfach angefärbten CD4-, CD8- und CD56-Zellen (in %) im Verlauf der 14 Tage dargestellt (Kinetik der Lymphozytensubpopulationen). Bei den mit (*) gekennzeichneten Spalten konnten keine Messungen durchgeführt werden.

Am Ende der Tabelle sind die arithmetischen Mittelwerte (\bar{x}) und die jeweilige Standardabweichungen (\pm) der 13 bzw. 11 Patienten aufgeführt.

Der Vergleich der Anzahl der Annexin-positiven (apoptotischen) Lymphozyten im Blut am Tag 0 und am Tag7 (bzw. Tag 3 bei CD56) zeigt eine Erhöhung der

- Annexin+ Gesamt-Lymphozyten um den Faktor **1.37** (\bar{x} 19,7% [\pm 2,7] vs. \bar{x} 27,0% [\pm 4,7]).
- Annexin+ CD4+- Lymphozyten um den Faktor **1.46** (\bar{x} 20,6% [\pm 5,2] vs. \bar{x} 30,2% [\pm 5,8]).
- Annexin+ CD8+- Lymphozyten um den Faktor **1.41** (\bar{x} 22,9% [\pm 5,4] vs. \bar{x} 32,4% [\pm 4,4]).
- Annexin+ CD56+- Lymphozyten um den Faktor **1.24** (\bar{x} 26,6% [\pm 6,6] vs. \bar{x} 33,1% [\pm 7,3]).

Der Vergleich der Anzahl der MIB-1-positiven (proliferierenden) Lymphozyten im Blut am Tag 0 und am Tag 7 (bzw. Tag 3 bei CD56) zeigt eine Erhöhung der

- MIB-1+ Gesamt-Lymphozyten um den Faktor **3.65** (\bar{x} 6,4% [\pm 2,7] vs. \bar{x} 23,4% [\pm 12,0]).
- MIB-1+ CD4+-Lymphozyten um den Faktor **4.21** (\bar{x} 9,3% [\pm 4,1] vs. \bar{x} 39,2% [\pm 18,0]).
- MIB-1+ CD8+-Lymphozyten um den Faktor **3.83** (\bar{x} 8,5% [\pm 5,1] vs. \bar{x} 32,6% [\pm 19,9]).
- MIB-1+ CD56+-Lymphozyten um den Faktor **2.15** (\bar{x} 22,2% [\pm 10,7] vs. \bar{x} 47,9% [\pm 15,2]).

Hiermit wird schon erkennbar, inwieweit die durch IL-2 bedingte Proliferation gegenüber der Apoptose bei allen Lymphozytensubpopulationen überwiegt.

4.1.2.2. Tabelle der Patientenbasisdaten

Dargestellt sind in der Tabelle die Basisdaten der 13 Patienten, deren Blut vor und während des IL-2 Zyklus untersucht wurde.

<i>Patient</i>	<i>Erstdiagnose</i>	<i>Stadium CDC/WHO</i>	<i>CD4- Zellen/μl</i>	<i>CD8- Zellen/μl</i>	<i>CD56- Zellen/μl</i>	<i>CD4/CD8- Quotient</i>	<i>Viruslast im Blut b-DNA (Eq/ml)</i>
1 MAN	1997	B1	2671	1578	624	1,7	< 500
2 FIG	1992	C3	596	1366	320	0,4	1625
3 PUR	1990	B3	352	1503	*	0,2	20010
4 CZM	1995	C3	141	997	121	0,1	261
5 ZIT	1995	B3	418	1017	127	0,4	18780
6 KOS	1986	B2	668	1097	243	0,6	3684
7 MER	1985	A3	186	2839	*	0,1	12990
8 LUS	1991	B2	538	1576	153	0,3	1806
9 SCH	1994	B2	876	835	276	1,0	< 500
10 SCJ	1996	A2	490	1943	49	0,3	10020
11 WAD	1994	C3	88	1606	443	0,1	225900
12 PEM	1989	C3	98	329	179	0,3	< 500
13 GEM	1994	B2	839	1511	95	0,6	1670

Tabelle 4.1.2.2.

Die Tabelle 4.1.2.2. zeigt die Basisdaten der 13 HIV-positiven Patienten (IL-2 und HAART), deren Blut während der IL-2 Therapie zu den Zeitpunkten vor Beginn des Zyklus (Tag 0) und 3, 7 und 14 Tage nach Zyklusbeginn auf ihre Proliferations- und Apoptoserate untersucht wurden. Die Daten entsprechen den Werten zu Beginn (d.h. Tag 0) des neuen IL-2 Zyklus. Die Stadieneinteilung der HIV-Infektion erfolgte nach der CDC-Klassifikation der WHO von 1993 [18]. CD4-, CD8- und CD56-Zellen wurden durch ein zelluläres Immunogramm bestimmt, die Maßeinheit entspricht Zellen/ μ l. Die Viruslast wurde mit Hilfe der „branched-chain“-DNA-Methode (b-DNA) bestimmt, die Maßeinheit ist in Virusäquivalenten pro ml (Eq/ml) angegeben.

4.1.3. Apoptose in Lymphknoten bei HIV-Patienten

4.1.3.1. Tabelle der Meßergebnisse und Patientenbasisdaten

Die Tabelle zeigt die Meßergebnisse und die Patientenbasisdaten zur Untersuchung der Apoptose in den Lymphknoten HIV-positiver Patienten ohne IL-2 Therapie.

<i>Patient</i>	<i>Erst-Diagnose</i>	<i>Stadium CDC</i>	<i>CD4-Zellen/μl</i>	<i>CD8-Zellen/μl</i>	<i>CD4/CD8 Quotient</i>	<i>Viruslast im Blut b-DNA (Eq/ml)</i>	<i>Viruslast im Lymphknoten</i>	<i>TUNEL⁺ Zellen pro mm²</i>
1 PIR	1995	A1	619	895	0,7	62742	*	20,8
2 BEH	1995	C2	486	713	0,7	> 500000	39860	28,8
3 SCM	1985	C3	21	144	0,1	790000	*	67,2
4 GED	1986	C3	86	893	0,1	*	1169	8,0
5 WER	1987	C3	9	44	0,2	> 500000	179	7,1
6 BEU	1989	B2	350	725	0,5	119000	1142	32,0
7 KIR	1995	B1	894	2262	0,4	1735	816	3,2
8 BUR	1985	A1	813	3896	0,2	27789	825	16,0
9 HES	1985	B1	878	1419	0,6	5559	1753	3,2
10 BOE	1989	B3	114	1135	0,1	327538	2020	12,8
11 KOE	1992	C3	22	410	0	123308	3151	8,0
12 SCE	1989	C2	505	508	0,9	53418	3920	16,0
13 MAK	1986	B2	517	1590	0,3	441	201	17,6
14 OST	1993	C3	27	536	0	91614	*	73,6
15 BUC	1986	B2	388	827	0,4	296	4989	38,4
16 HAL	1995	A1	671	1079	0,6	2419	471	24,0
17 WAD	1994	C3	237	3051	0	46332	345	28,8
18 HIV	1995	C3	103	388	0,2	35770	55	9,6
19 WEB	1995	A2	444	1103	0,4	*	789	1,6
20 FIG	1992	C2	388	790	0,5	1445	472	49,0
21 SCJ	1996	A1	554	1099	0,5	3847	970	38,0
22 WEN	1996	B2	278	974	0,3	1395	19559	40,5
23 SCW	1994	B2	572	735	0,7	< 500	27	22,4
24 GRD	1996	A3	192	690	0,3	496300	348	40,0
25 MAN	1997	A1	933	1023	0,9	42430	4798	0

Tabelle 4.1.3.1.

Tabelle 4.1.3.1.

Die Tabelle 4.1.3.1. zeigt die Basisdaten der 25 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne IL-2 erhielten. Die Daten entsprechen den Werten zum Zeitpunkt der Lymphknotenexstirpation. Die Stadieneinteilung der HIV-Infektion erfolgte nach der CDC-Klassifikation der WHO von 1993 [18]. CD4-Zellen und CD8-Zellen wurden durch ein zelluläres Immunogramm bestimmt, die Maßeinheit entspricht Zellen/ μ l. Die Viruslast im Blut wurde mit Hilfe der „branched-chain“-DNA-Methode (b-DNA) bestimmt, die Maßeinheit entspricht Virusäquivalente/ml (Eq/ml). Die Viruslast im Lymphknoten wurde nach RNA Extraktion mit Hilfe der Guanidin-Isothiocyanat Methode bestimmt [27, 45, 50, 116], die Maßeinheit ist HIV-Kopien/ μ g RNA. Bei den mit (*) gekennzeichneten Spalten lagen keine aktuellen Viruslastergebnisse vor. Die apoptotischen Lymphozyten wurden pro mm^2 Lymphknotenfläche unter dem Lichtmikroskop ausgezählt (siehe Kapitel 3.2.5. unter Punkt 14).

Die durchschnittliche Apoptoserate der 25 Patienten betrug \bar{x} 24,2 TUNEL+ Zellen/ mm^2 (Standardabweichung von $\pm 19,6$). Wie in Kapitel 4.2.3. noch dargestellt werden wird, besteht eine Korrelation zwischen steigender Apoptoserate, schwächer werdendem Immunsystem (fallende CD4-Zellzahl) und erhöhter Viruslast.

4.1.4. Einfluß von IL-2 auf Apoptose und Proliferation von Lymphozyten in Lymphknoten bei HIV-Patienten

4.1.4.1. Tabelle der Meßergebnisse der Apoptose

Die Tabelle 4.1.4.1. zeigt die Ergebnisse der Apoptose in den Lymphknoten bei 5 Patienten vor und nach 6 (bzw. nach 24) Monaten unter IL-2 Therapie. Pro Patient sind die Anzahl der TUNEL+ (apoptotischen) Lymphozyten pro mm² Lymphknotenfläche vor und nach Therapiebeginn aufgeführt. Weiterhin werden die doppeltgefärbten Lymphozyten (TUNEL mit CD4, CD8 und mit CD57) unterschieden. Am Ende der Tabelle ist der jeweilige arithmetische Mittelwert (\bar{x}) und die Standardabweichung (\pm) aufgeführt.

<i>Patient unter IL-2 Therapie</i>	<i>Anzahl TUNEL+ Zellen gesamt/mm²</i>	<i>Anzahl TUNEL+CD4+ Zellen/mm²</i>	<i>Anzahl TUNEL+CD8+ Zellen/mm²</i>	<i>Anzahl TUNEL+CD57+ Zellen/mm²</i>
1 FIG vor	49	1,4	3,2	1,6
6 Monate	110	4,8	9,6	3,2
2 SCJ vor	38	3,2	6,4	1,6
6 Monate	110	8	14,4	1,6
24 Monate	34	9,6	4,2	0
3 WEN vor	40	1,6	4,8	1,6
6 Monate	70	3,2	4	1,6
4 SCW vor	22	0,1	1,6	0,1
6 Monate	43	1,6	1,6	3,2
5 GRD vor	40	4,8	4,8	0,1
6 Monate	104	11,2	14,4	3,2
vor	\bar{x} 37,8 \pm 9,8	\bar{x} 1,9 \pm 1,5	\bar{x} 4,1 \pm 1,8	\bar{x} 1,0 \pm 0,8
6 Monate	\bar{x} 87,4 \pm 29,8	\bar{x} 5,7 \pm 3,8	\bar{x} 8,8 \pm 5,8	\bar{x} 2,5 \pm 0,8

Tabelle 4.1.4.1.

4.1.4.2. Tabelle der Meßergebnisse der Proliferation

Die Tabelle 4.1.4.2. zeigt die Ergebnisse der Proliferation in den Lymphknoten bei 5 Patienten vor und nach 6 (bzw. nach 24) Monaten unter IL-2 Therapie. Pro Patient sind die Anzahl der MIB-1-positiven (proliferierenden) Lymphozyten pro mm² Lymphknotenfläche vor und nach Therapiebeginn aufgeführt. Weiterhin werden die doppeltgefärbten Lymphozyten (MIB-1 mit CD4, CD8 und mit CD57) unterschieden. Am Ende der Tabelle ist der jeweilige arithmetische Mittelwert (\emptyset) und die Standardabweichung (\pm) aufgeführt.

<i>Patient unter IL-2 Therapie</i>	<i>Anzahl MIB-1+ Zellen gesamt/mm²</i>	<i>Anzahl MIB-1+CD4+ Zellen/mm²</i>	<i>Anzahl MIB-1+CD8+ Zellen/mm²</i>	<i>Anzahl MIB-1+CD57+ Zellen/mm²</i>
1 FIG vor	560	166	144	37
6 Monate	700	237	149	61
2 SCJ vor	748	26	20	18
6 Monate	908	42	120	122
24 Monate	1286	406	208	118
3 WEN vor	534	40	42	18
6 Monate	790	42	53	32
4 SCW vor	137	10	18	5
6 Monate	275	16	21	16
5 GRD vor	627	64	88	82
6 Monate	1401	98	256	245
vor	\emptyset 521,2 \pm 230	\emptyset 61,2 \pm 61,8	\emptyset 62,4 \pm 53,6	\emptyset 32 \pm 30,2
6 Monate	\emptyset 814,8 \pm 405,2	\emptyset 87 \pm 89	\emptyset 119,8 \pm 91,6	\emptyset 95,2 \pm 92,9

Tabelle 4.1.4.2.

Die apoptotischen Zellen im Lymphknoten (Tab. 4.1.4.1.) stiegen unter 6 Monaten IL-2 Therapie zwar um den Faktor 2.3 und die proliferierenden Zellen (Tab. 4.1.4.2.) nur um den Faktor 1.56, trotzdem überwiegt die Gesamtmenge der MIB-1-positiven Zellen aber mit 521,2/mm² vor bzw. 814,8/mm² nach IL-2 Therapie deutlich die Menge der TUNEL-positiven Zellen (vor: 37,8, nach: 87,4 Zellen/mm²).

4.1.4.3. Tabelle der Patientenbasisdaten

Die Tabelle 4.1.4.3. zeigt die Basisdaten der 5 HIV-positiven Patienten, die neben der antiretroviralen Therapie IL-2 erhielten und denen vor Beginn der IL-2 Therapie und nach 6 (bzw. nach 24) Monaten unter IL-2 Therapie ein Lymphknoten entnommen wurde.

<i>Patient unter IL-2 Therapie</i>	<i>Erstdiagnose</i>	<i>Stadium CDC</i>	<i>CD4-Zellen/μl</i>	<i>CD8-Zellen/μl</i>	<i>CD56-Zellen/μl</i>	<i>CD4/CD8-Quotient</i>	<i>Viruslast im Blut (b-DNA) Eq/ml</i>	<i>Viruslast im Lymphknoten (HIV-Kopien/μg RNA)</i>
1 FIG vor	1992	C2	388	790	161	0,5	1445	472
6 Monate	1992	C2	764	1272	339	0,6	5261	1367
2 SCJ vor	1996	A1	554	1099	53	0,5	3847	970
6 Monate	1996	A1	842	2001	62	0,4	2564	944
24 Monate	1996	A2	260	863	14	0,3	24523	*
3 WEN vor	1996	B2	278	974	29	0,3	1395	19559
6 Monate	1996	C3	343	1187	68	0,3	12810	3773
4 SCW vor	1994	B2	572	735	163	0,8	< 500	27
6 Monate	1994	B2	701	652	182	1,1	< 500	7
5 GRD vor	1996	A3	630	1453	241	0,4	496300	348
6 Monate	1996	A3	416	1077	89	0,4	129500	4298

Tabelle 4.1.4.3.

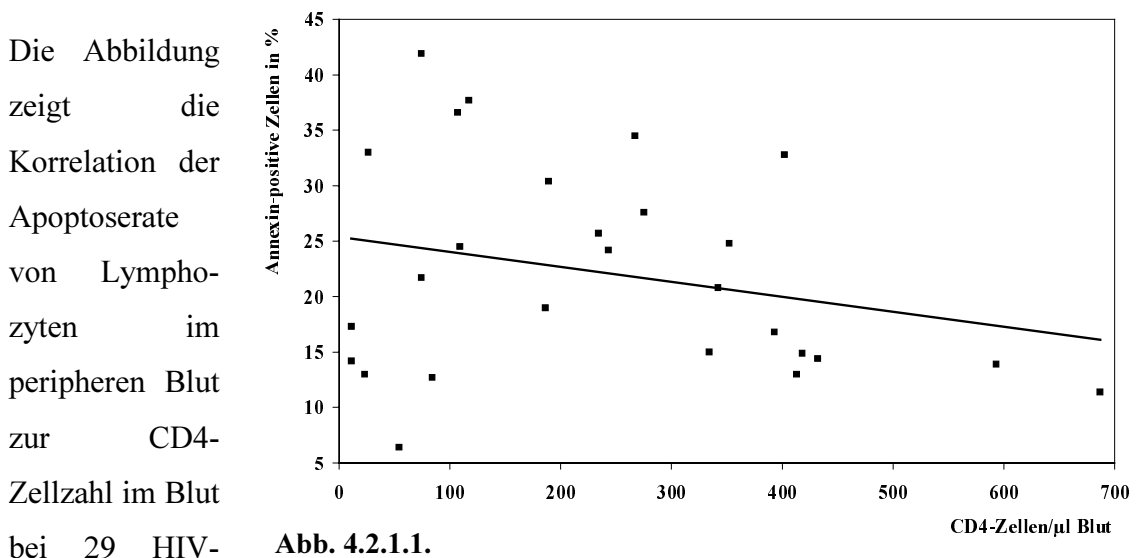
Die Daten entsprechen den Werten zum Zeitpunkt der Lymphknotenexstirpation. Die Stadieneinteilung der HIV-Infektion erfolgte nach der CDC-Klassifikation der WHO von 1993 [18]. CD4-, CD8- und CD56-Zellen wurden durch ein zelluläres Immunogramm bestimmt, die Maßeinheit entspricht Zellen/ μ l. Die Viruslast wurde mit Hilfe der „branched-chain“-DNA-Methode (b-DNA) bestimmt, die Maßeinheit entspricht Virusäquivalente pro Milliliter (Eq/ml). Die Viruslast im Lymphknoten wurde nach RNA Extraktion mit Hilfe der Guanidin-Isothiocyanat Methode bestimmt [27, 45, 50, 116], die Maßeinheit ist HIV-Kopien/ μ g RNA.

4.2. Apoptose

4.2.1. Apoptose in peripheren Blutlymphozyten bei Patienten ohne IL-2 Therapie

4.2.1.1. Korrelation der CD4-Zellzahl zu den apoptotischen Lymphozyten im peripheren Blut

Ein möglicher Mechanismus des fortschreitenden CD4-Zellverlustes bei HIV-positiven Patienten ist die übermäßige Apoptose von infizierten und nicht infizierten Immunzellen. Deshalb wurde die Apoptoserate der Lymphozyten im peripheren Blut untersucht und mit dem CD4-Zellstatus verglichen.



positiven Patienten in verschiedenen Stadien der Erkrankung. Diese Patienten erhielten eine antiretrovirale Therapie (ART), aber kein Interleukin-2. Jeder Punkt im Schaubild entspricht einem Patienten; die CD4-Zellzahl zum Zeitpunkt der Blutentnahme ist auf der x-Achse aufgetragen. Auf der y-Achse ist der Prozentsatz der apoptotischen (Annexin-positiven) Lymphozyten aufgetragen. Es zeigt sich eine deutliche Korrelation der beiden Parameter ($r = -0,26$). Je fortgeschrittener der Immundefekt ist, erkennbar an den abgesunkenen CD4-Zellzahlen, desto höher ist die Rate der apoptotischen Lymphozyten im peripheren Blut.

Die Patientenbasisdaten und die einzelnen Ergebnisse zu dieser Abbildung sind systematisch in der Tabelle 4.1.1.1. auf den Seiten 53-54 dargestellt.

4.2.1.2. Korrelation der Viruslast mit der Apoptose im peripheren Blut

Nachdem die Apoptoserate mit der CD4-Zellzahl invers korrelierte, wurde untersucht, ob die Viruslast im Blut ebenfalls einen Zusammenhang mit der Apoptose aufwies. Dies wäre zu erwarten, da die CD4-Zellzahl und die Viruslast invers korreliert sind (siehe Kapitel 4.4.1.3. auf der Seite 106).

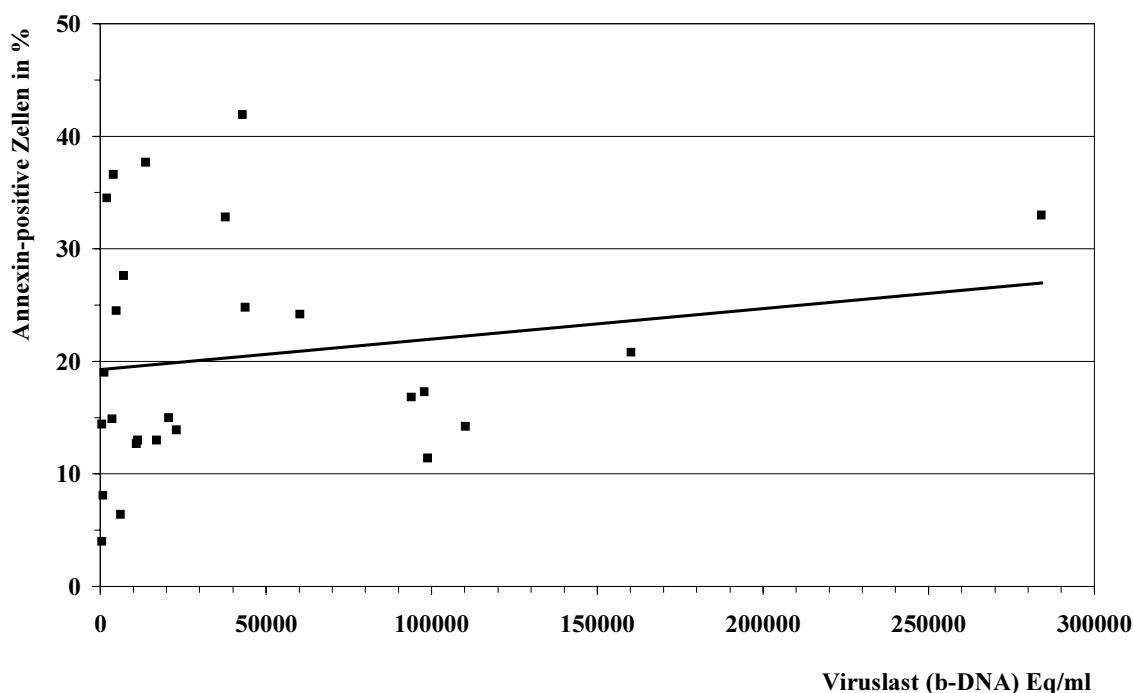


Abb. 4.2.1.2.

Die Abbildung 4.2.1.2. zeigt die Korrelation der Apoptoserate von Lymphozyten (Annexin-positiv) im Blut zur Viruslast (b-DNA [Eq/ml]) im Blut bei 29 HIV-positiven Patienten in verschiedenen Stadien der Erkrankung. Diese Patienten erhielten eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne IL-2. Jeder Punkt im Schaubild entspricht einem Patienten; die Viruslast zum Zeitpunkt der Blutentnahme ist auf der x-Achse aufgetragen. Auf der y-Achse ist der Prozentsatz der Annexin-positiven, d.h. apoptotischen Lymphozyten aufgetragen. Es zeigt sich eine schwache Korrelation der beiden Parameter ($r = 0,17$). Je höher die Konzentration von HI-Viren im Blut, desto höher ist die Rate der apoptotischen Lymphozyten im peripheren Blut.

Die Patientenbasisdaten und die einzelnen Ergebnisse sind systematisch in Tabelle 4.1.1.1. auf den Seiten 53-54 dargestellt.

4.2.1.3. Vergleich der CD4-Zellzahl zu den apoptotischen Zellen im peripheren Blut

Nachdem die inverse Korrelation der Apoptoserate mit der CD4-Zellzahl gezeigt werden konnte, macht die folgende Abbildung diesen Zusammenhang in anderer Form, durch den Vergleich zweier Patientenkollektive mit unterschiedlichem Immunstatus, deutlich.

Die Abbildung zeigt zwei Patientenkollektive mit weniger als 300 bzw. mit mehr als 300 CD4-Zellen/ μ l Blut. Die

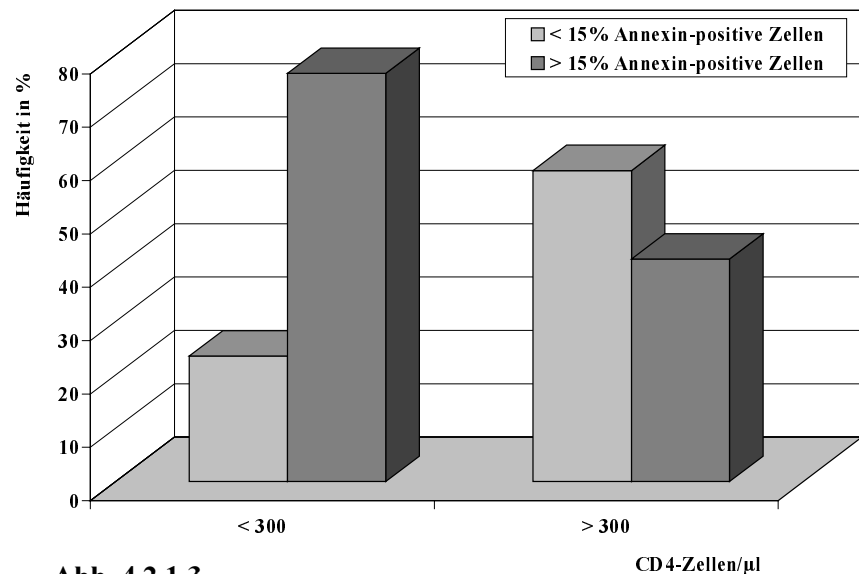


Abb. 4.2.1.3.

beiden Kollektive unterteilen sich noch einmal in zwei Gruppen: Patienten mit weniger als 15% und Patienten mit mehr als 15% apoptotischen (Annexin-positiven) Zellen im peripheren Blut. Es handelt sich wiederum um das Patientenkollektiv mit 29 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne IL-2 erhielten. Die Messung der CD4-Zellen erfolgte zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

Es fällt auf, daß Patienten mit weniger als 300 CD4-Zellen/ μ l in 76,5% mehr als 15% apoptotische (Annexin-positive) Zellen im peripheren Blut aufwiesen. Umgekehrt hatten Patienten mit einer hohen CD4-Zellzahl von mehr als 300/ μ l in 58,3% weniger als 15% apoptotische Zellen im peripheren Blut. Das heißt, daß bei einem schlechten Immunstatus die Apoptoserate im peripheren Blut erhöht ist.

Die Patientenbasisdaten und die einzelnen Ergebnisse sind systematisch in Tabelle 4.1.1.1. auf den Seiten 53-54 dargestellt.

4.2.1.4. Vergleich des Stadiums der HIV-Erkrankung mit der Apoptoserate im peripheren Blut

Daß der Verlust der CD4-Zellen mit einer erhöhten Apoptoserate einhergeht, ist in den vorangegangenen Abbildungen gezeigt worden. Im folgenden ist nun die Stadienabhängigkeit der Apoptose dargestellt.

Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Apoptose in peripheren Lymphozyten von dem Stadium der HIV-

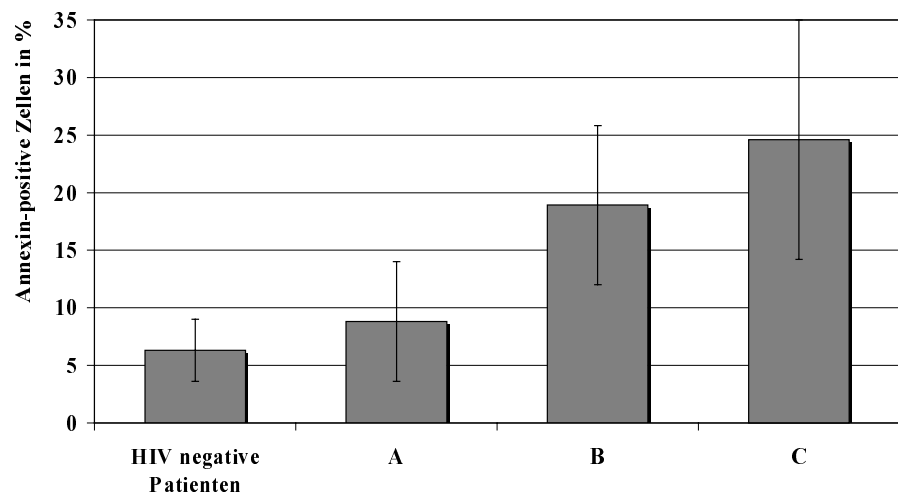


Abb. 4.2.1.4.

Stadium der HIV-Infektion nach CDC

Das Stadium der Erkrankung wird nach der CDC (Centers for Disease Control)-Klassifikation der WHO von 1993 [18] eingeteilt. Bei den Patienten handelt es sich um die 29 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne IL-2 erhielten und um 3 gesunde Kontrollpersonen. Auf der x-Achse sind die Kontrollgruppe und die drei klinischen Kategorien (A, B, C) der CDC-Klassifikation aufgetragen, ohne weitere Aufteilung der Laborkategorien 1-3 (1: ≥ 500 CD4-Zellen/ μ l, 2: 200-499 CD4-Zellen/ μ l, 3: <200 CD4-Zellen/ μ l). Auf der y-Achse findet sich die Apoptoserate in Prozent, d.h. der Anteil der Annexin-positiven Lymphozyten an der Lymphozytengesamtheit. Die Apoptoserate liegt in der HIV-negativen Kontrollgruppe bei \bar{x} 6,3% (\pm 2,7), in den beiden klinischen Kategorien A (asymptomatisches Stadium) und B (symptomatische Patienten ohne AIDS) bei \bar{x} 8,8% (\pm 5,2) bzw. bei \bar{x} 18,9% (\pm 6,9). In der klinischen Kategorie C (symptomatische Patienten mit AIDS) liegt die Apoptoserate mit \bar{x} 24,6% (\pm 10,4) apoptotischen Lymphozyten wesentlich höher.

Die Patientenbasisdaten und die einzelnen Ergebnisse sind systematisch in Tabelle 4.1.1.1. auf den Seiten 53-54 dargestellt.

4.2.2. Apoptose in peripheren Blutlymphozyten bei Patienten unter IL-2 Therapie

4.2.2.1. Verlauf der Apoptose in peripheren Blutlymphozyten während des IL-2 Zyklus bei 13 Patienten

Im folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt, die durchgeführt wurden, um den Einfluß einer subkutanen Interleukin-2 Gabe auf die Apoptose von verschiedenen Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut bei HIV-positiven Patienten zu ermitteln.

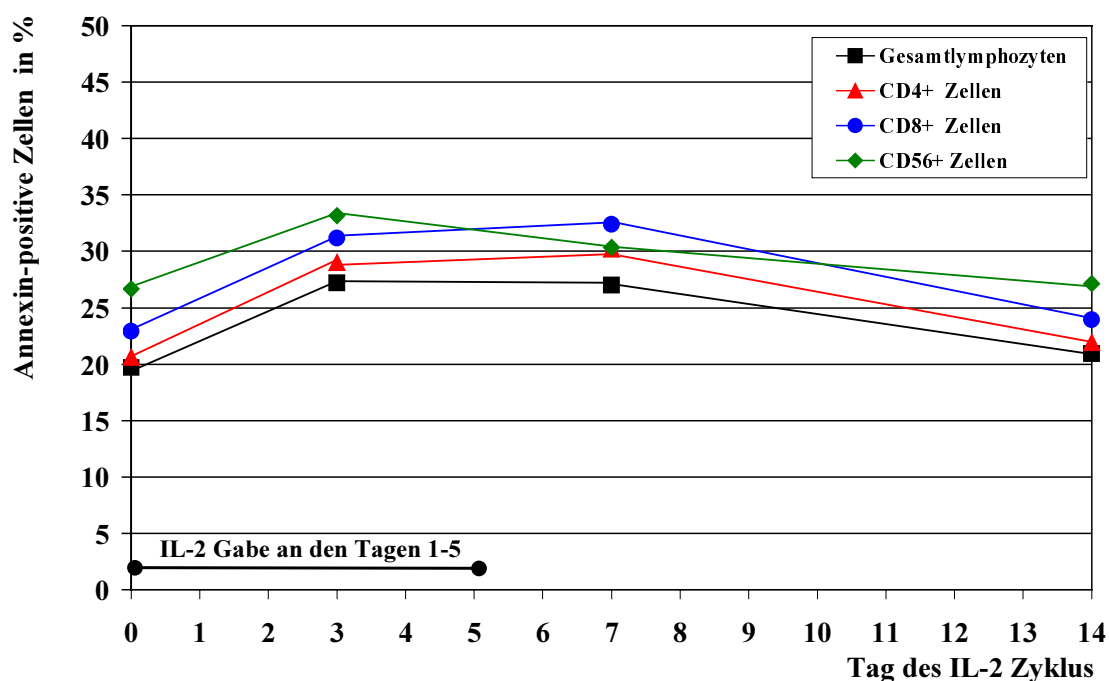


Abb. 4.2.2.1.

Die Abbildung 4.2.2.1. zeigt die Apoptose der Lymphozyten im peripheren Blut während eines IL-2 Zyklus (jeweils 3. bzw. 4. IL-2-Zyklus) bei 13 HIV-positiven Patienten, davon 2 Patienten im Stadium A2-3, 7 Patienten im Stadium B1-3 und 4 Patienten im Stadium C3 (nach CDC/WHO-Klassifikation [18]). Die Blutentnahmen erfolgten vor Beginn (Tag 0) des neuen IL-2 Zyklus, sowie zu den Zeitpunkten Tag 3, 7 und 14 nach Beginn des Zyklus (IL-2 Injektionen an den Tagen 1-5). Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte aufgetragen, auf der y-Achse die prozentuale Häufigkeit der Annexin-positiven, d.h. der apoptotischen Zellen im Blut.

Untersucht wurde die Gesamtzahl der Lymphozyten, sowie die verschiedenen Subpopulationen CD4, CD8, CD56.

Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Apoptoserate bei allen Lymphozyten bis zum siebten Tag und einen darauffolgenden Abfall der Apoptoserate nach zwei Wochen bis fast auf die Ausgangswerte.

Der Vergleich der Anzahl der Annexin-positiven (apoptotischen) Lymphozyten im Blut am Tag 0 und am Tag7 (bzw. Tag 3 bei CD56) zeigt eine Erhöhung der

- Annexin+ Gesamt-Lymphozyten um den Faktor **1.37** (\bar{x} 19,7% [\pm 2,7] vs. \bar{x} 27,0% [\pm 4,7]).
- Annexin+ CD4+- Lymphozyten um den Faktor **1.46** (\bar{x} 20,6% [\pm 5,2] vs. \bar{x} 30,2% [\pm 5,8]).
- Annexin+ CD8+- Lymphozyten um den Faktor **1.41** (\bar{x} 22,9% [\pm 5,4] vs. \bar{x} 32,4% [\pm 4,4]).
- Annexin+ CD56+- Lymphozyten um den Faktor **1.24** (\bar{x} 26,6% [\pm 6,6] vs. \bar{x} 33,1% [\pm 7,3]).

Eine detaillierte und systematische Zusammenfassung aller Meßergebnisse und die Basisdaten der Patienten finden sich am Anfang dieses Kapitels in den Tabellen 4.1.2.1. bzw. 4.1.2.2. auf den Seiten 55-59.

4.2.2.2. Relative Apoptose der CD4-, CD8- und CD56-Zellen im peripheren Blut während des IL-2 Zyklus (Tag 0 und Tag 7) bei 13 Patienten

Zur Darstellung der relativen Apoptoserate der CD4-, CD8- und CD56-Zellen wurde der Anteil apoptotischer CD4-, CD8- und CD56-Zellen an der Gesamtheit der jeweiligen Lymphozytensubpopulation korreliert.

Die Abbildungen zeigen die relative Apoptose der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut während des Interleukin-2 Zyklus bei 13 HIV-positiven Patienten. Die Blutentnahmen erfolgten einen Tag vor Beginn (Tag 0) des neuen IL-2 Zyklus, sowie zu den Zeitpunkten Tag 3, 7 und 14 nach Beginn des Zyklus (IL-2 Gabe an den Tagen 1-5). Dargestellt sind hier der Tag 0 und Tag 7 als Zeitpunkt der höchsten Apoptoserate. Mit Hilfe des Durchflußzytometers wurden die Lymphozytensubpopulationen aus peripherem Venenblut gemessen. Auf der x-Achse ist der prozentuale Anteil der CD4-, CD8- und CD56-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl aufgetragen. Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil der Annexin-positiven, d.h. der apoptotischen CD4-, CD8- und CD56-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl aufgetragen. Schwarze Symbole entsprechen den Werten zum Zeitpunkt Tag 0, die farbigen Symbole geben die Daten zum Zeitpunkt Tag 7 wieder.

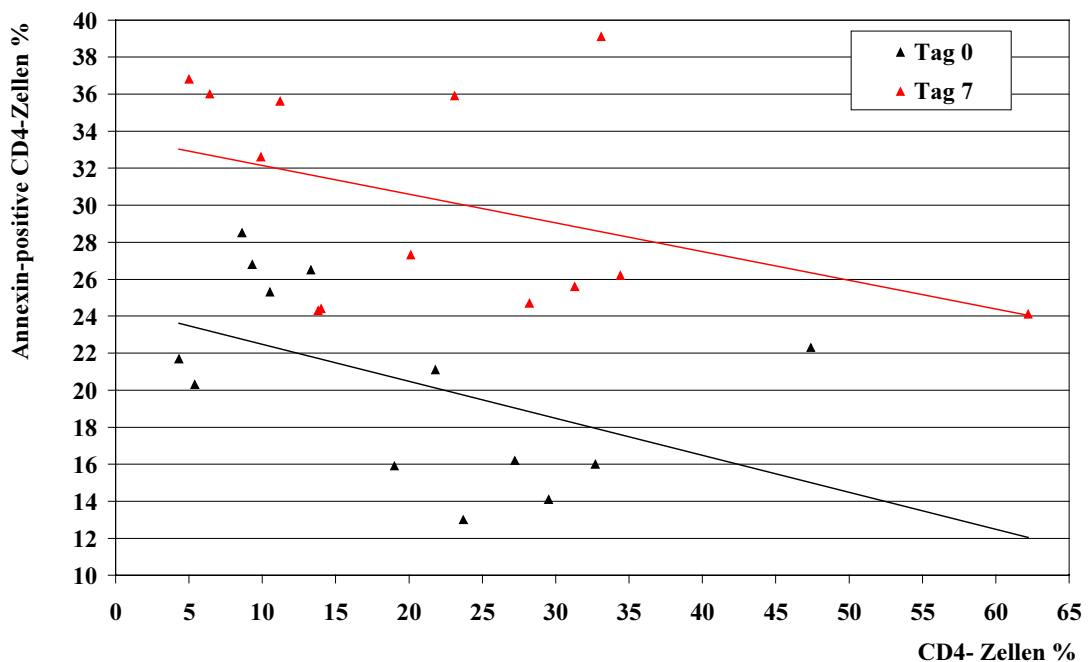


Abb. 4.2.2.2.1.

Die Fraktion der apoptotischen CD4-Lymphozyten (Annexin-positiv) korrelierte invers mit der relativen CD4-Zellzahl, sowohl vor Beginn des neuen IL-2 Zyklus (Tag 0), als auch verstärkt am Tag 7 (2. Tag nach Ende der IL-2 Gabe). Dies zeigt, daß geringe CD4-Zellzahlen mit einer hohen Apoptoserate (verstärkte Expression von Phosphatidylserin) der CD4-Lymphozyten einhergehen. Auch nach IL-2 Gabe (Tag 7) blieb dieser Trend erkennbar. Vor allem die Patienten mit einem relativ niedrigen prozentualen Anteil an CD4-Zellen zeigten unter IL-2 Gabe einen höheren Anteil an apoptotischen CD4-Zellen (Abb. 4.2.2.2.1.).

Dahingegen zeigte die Fraktion der apoptotischen CD8-Lymphozyten (Annexin-positiv) keine Korrelation mit der relativen Zahl der CD8-Zellen am Tag 0. Am Tag 7 war jedoch eine umgekehrte Korrelation zu erkennen. IL-2 schien eine deutlich höhere Apoptoserate der CD8-Lymphozyten bei Patienten mit niedrigen CD8-Zellzahlen, ähnlich der IL-2 Wirkung auf CD4-Zellen, zu bewirken (Abb. 4.2.2.2.2.).

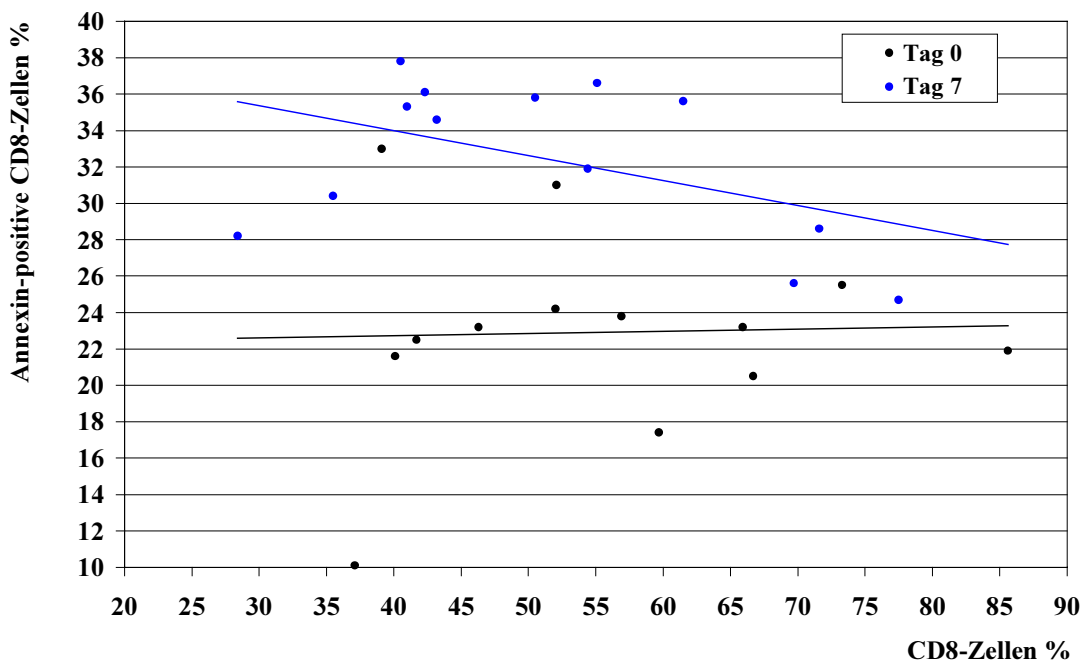
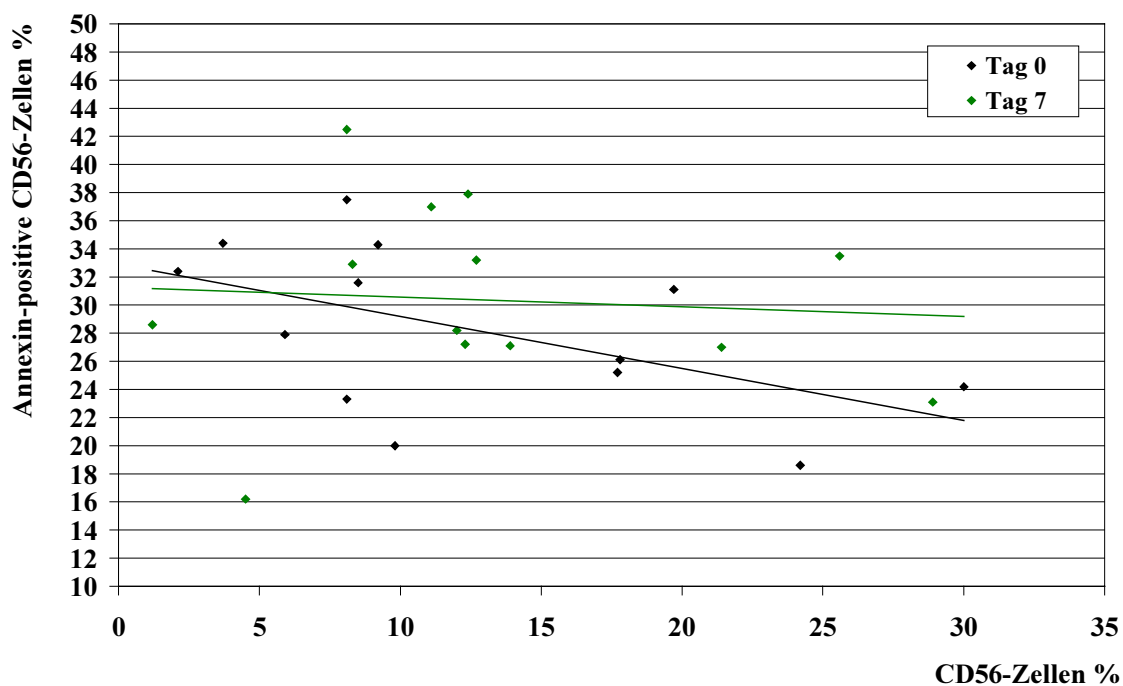


Abb. 4.2.2.2.2.

Die Fraktion der apoptotischen CD56-Lymphozyten (Annexin-positiv) zeigte am Tag 0 eine umgekehrte Korrelation mit der relativen CD56-Zellzahl. Geringe absolute CD56-Zellzahlen schienen mit einer hohen Apoptoserate (verstärkte Expression von Phosphatidylserin) der CD56-Lymphozyten einherzugehen. Am Tag 7, d.h. zwei Tage nach Ende der IL-2 Gabe, verlor sich diese Korrelation. Die Apoptoserate der CD56-

Zellen war bei allen Patienten, sowohl bei niedrigen als auch bei hohen relativen CD56-Zellzahlen gleich (Abb. 4.2.2.2.3.).

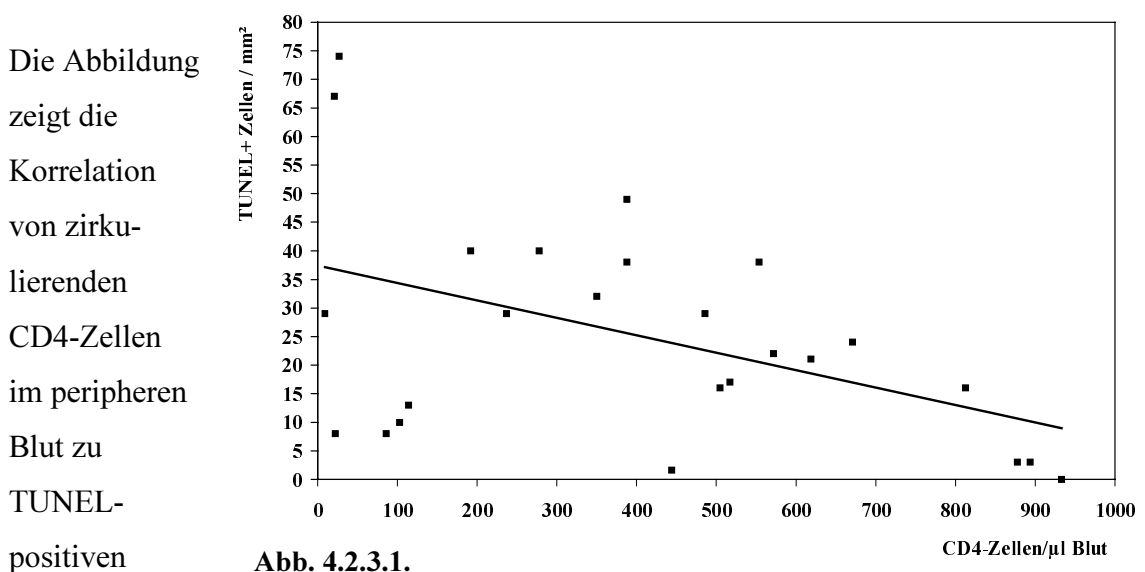


Bei allen Lymphozytensubpopulationen zeigte sich am Tag 7 im Vergleich zum Tag 0 ein deutlicher Anstieg des prozentualen Anteils der apoptotischen Lymphozytensubpopulationen.

4.2.3. Apoptose in Lymphknoten bei Patienten ohne IL-2 Therapie

4.2.3.1. Korrelation der CD4-Zellzahl im peripheren Blut zu den apoptotischen Lymphozyten im Lymphknoten

Ein möglicher Mechanismus des fortschreitenden CD4-Zellverlustes bei HIV-positiven Patienten ist die übermäßige Apoptose von infizierten und nicht infizierten Immunzellen. Deshalb wurde die Apoptoserate der Lymphozyten, ähnlich wie schon zuvor im peripheren Blut (Abb. 4.2.1.1.) in Lymphknoten untersucht und mit dem CD4-Zellstatus verglichen.



(apoptotischen) Zellen im Lymphknoten. Jeder Punkt im Schaubild entspricht einem Patienten; die CD4-Zellzahl/µl Blut zum Zeitpunkt der Lymphknotenexstirpation ist auf der x-Achse aufgetragen. Untersucht wurden Paraffinschnitte von 25 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne IL-2 erhielten.

Die Auswertung ergab vergleichbare Ergebnisse mit der Untersuchung der peripheren Blutlymphozyten auf die Apoptose (siehe Abb. 4.2.1.1. auf der Seite 65). Es zeigte sich eine deutliche Korrelation ($r=-0,463$) der CD4-Zellzahl mit der Apoptoserate: Je höher die CD4-Zellzahl, desto geringer die Apoptoserate. Und umgekehrt: Je mehr die CD4-Zellzahl im Blut absank, desto höher war die Apoptoserate im Lymphknoten.

Die Patientenbasisdaten und die einzelnen Ergebnisse zu dieser Abbildung sind systematisch in der Tabelle 4.1.3.1. auf den Seiten 60-61 dargestellt.

4.2.3.2. Vergleich der CD4-Zellen im peripheren Blut zu den apoptotischen Lymphozyten in den Lymphknotenschnitten

Nachdem die inverse Korrelation der Apoptoserate im Blut (Abb. 4.2.1.1., Seite 65) und in Lymphknoten (Abb. 4.2.3.1., Seite 74) mit der CD4-Zellzahl gezeigt werden konnte, macht die folgende Abbildung diesen Zusammenhang in anderer Form deutlich. Ähnlich wie im peripheren Blut (Abb. 4.2.1.3., Seite 67) wird die Apoptose, in den Lymphknoten zweier Patientenkollektive mit unterschiedlichem Immunstatus, verglichen.

Die Abbildung zeigt zwei Patientenkollektive mit weniger als 500 bzw. mit mehr als 500 CD4-Zellen/ μ l

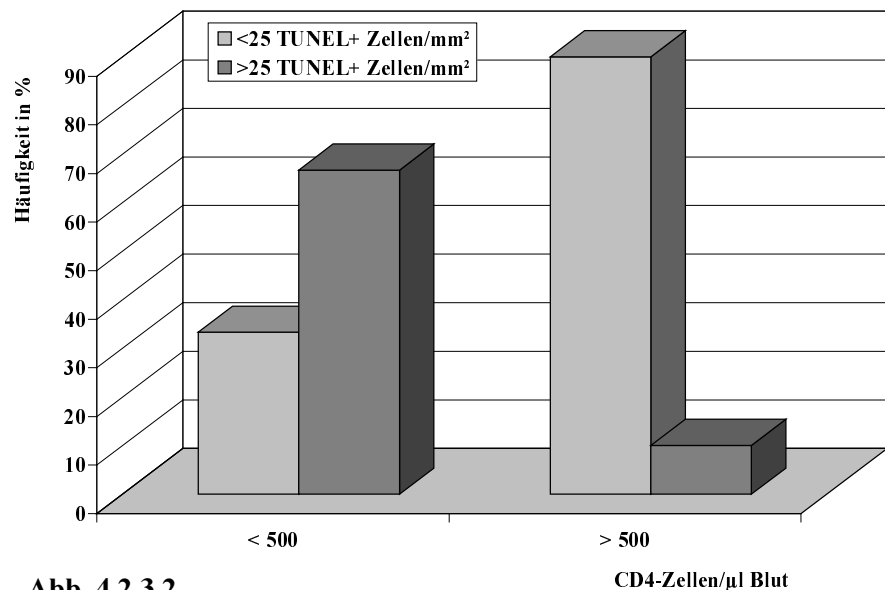


Abb. 4.2.3.2.

Blut. Die beiden Kollektive unterteilen sich noch einmal in zwei Gruppen: Patienten mit weniger als 25 und Patienten mit mehr als 25 TUNEL-positiven (apoptotischen) Zellen/mm² Lymphknotenschnitt. Es handelt sich wieder um das Patientenkollektiv mit 25 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne IL-2 erhielten. Die Messung der CD4-Zellen erfolgte zu den Zeitpunkten der Lymphknotenexstirpation. Es fällt auf, daß Patienten mit weniger als 500 CD4-Zellen in 66,7% mehr als 25 apoptotische Zellen/mm² aufweisen. Umgekehrt haben Patienten mit einer hohen CD4-Zellzahl von mehr als 500/ μ l in 90% weniger als 25 apoptotische Zellen/mm². Das heißt, daß bei einem schlechten Immunstatus die Apoptoserate im Lymphknoten wie auch im peripheren Blut (siehe Abbildung 4.2.1.3., Seite 67) erhöht ist. Die Patientenbasisdaten und die einzelnen Ergebnisse zu dieser Abbildung sind systematisch in der Tabelle 4.1.3.1. auf den Seiten 60-61 dargestellt.

4.2.3.3. Vergleich des Stadiums der HIV-Infektion mit den apoptotischen Zellen in Lymphknoten

Daß der Verlust der CD4-Zellen mit einer erhöhten Apoptoserate einhergeht, ist in den vorangegangenen Abbildungen gezeigt worden. Im folgenden ist nun die Stadienabhängigkeit der Apoptose dargestellt.

Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Apoptose in Lymphknoten von dem Stadium der HIV-Infektion.

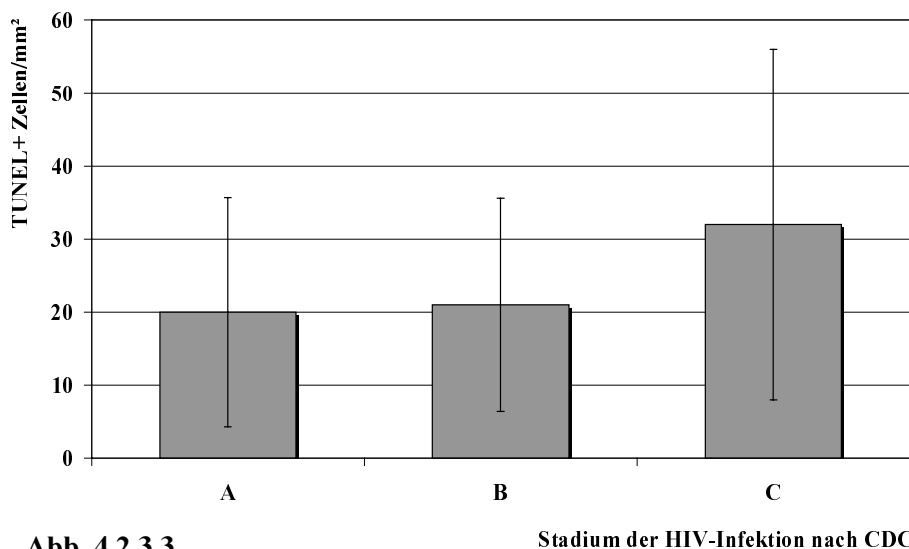


Abb. 4.2.3.3.

Das Stadium

der Erkrankung wird nach der CDC (Centers for Disease Control)-Klassifikation der WHO von 1993 [18] eingeteilt. Bei den Patienten handelt es sich um die 25 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne IL-2 erhielten. Auf der x-Achse sind die drei klinischen Kategorien (A, B, C) der CDC-Klassifikation ohne weitere Aufteilung der Laborkategorien 1-3 (1: ≥ 500 CD4-Zellen/ μ l, 2: 200-499 CD4-Zellen/ μ l, 3: <200 CD4-Zellen/ μ l) aufgetragen. Auf der y-Achse findet sich die Apoptoserate, d.h. die Menge der TUNEL-positiven Zellen/mm². Die Werte der TUNEL-positiven, d.h. der apoptotischen Lymphozyten im Lymphknoten liegen in den beiden klinischen Kategorien A (asymptomatisches Stadium) und B (symptomatische Patienten ohne AIDS) bei \bar{x} 20 ($\pm 15,7$) bzw. bei \bar{x} 21 ($\pm 14,6$) Zellen/mm². In der klinischen Kategorie C (symptomatische Patienten mit AIDS) liegt die Apoptoserate mit \bar{x} 32 (± 24) apoptotischen Lymphozyten wesentlich höher. Lymphknoten HIV-negativer Personen als Kontrolle standen leider nicht zur Verfügung. Die Patientenbasisdaten und die einzelnen Ergebnisse zu dieser Abbildung sind systematisch in der Tabelle 4.1.3.1. auf den Seiten 60-61 dargestellt.

4.2.3.4 Korrelation der Apoptoserate mit der Viruslast in Lymphknoten

Ein möglicher Mechanismus der Apoptose beruht auf der Tatsache, daß gerade virusinfizierte Zellen die Apoptose induzieren. Deswegen wurde der Zusammenhang zwischen der Apoptose und der Viruslast in Lymphknoten untersucht.

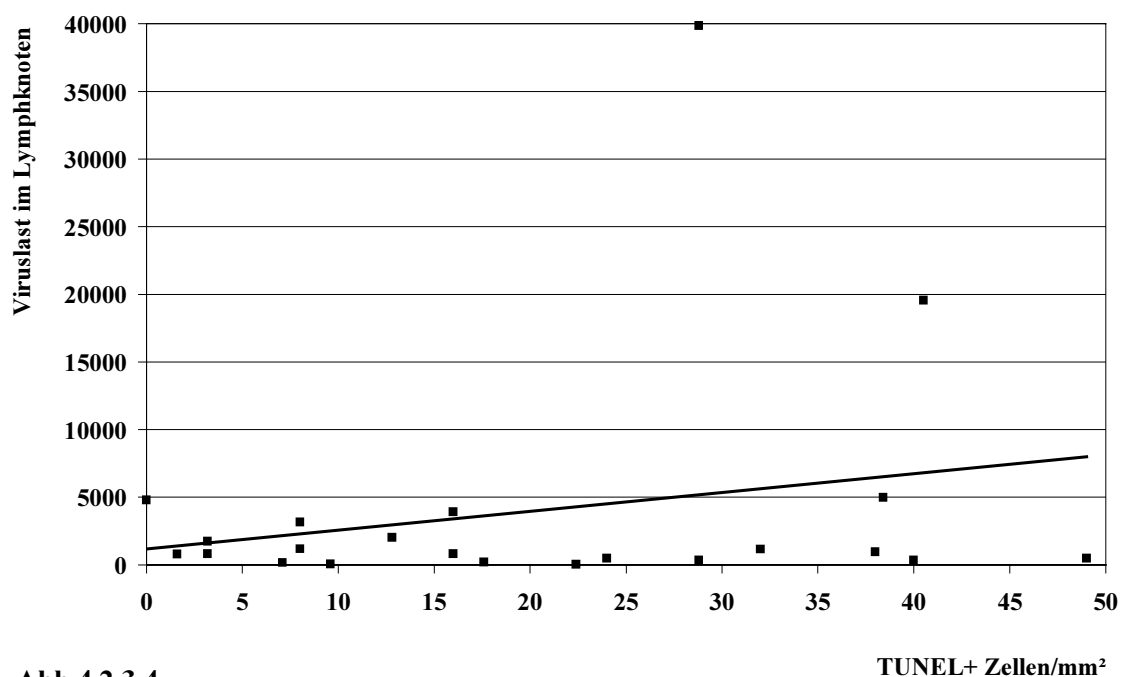


Abb.4.2.3.4.

Die Abbildung 4.2.3.4. zeigt die TUNEL-positiven (apoptotischen) Zellen/mm² im Lymphknoten im Verhältnis zur Viruslast im Lymphknoten (HIV Kopien/μg RNA). Jeder Punkt im Schaubild entspricht einem Patienten; die Apoptoserate ist auf der x-Achse aufgetragen, die Viruslast im Lymphknoten auf der y-Achse. Untersucht wurden Paraffinschnitte von 25 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne IL-2 erhielten.

Es zeigt sich eine schwache Korrelation ($r=0,227$) der Apoptoserate mit der Viruslast im Lymphknoten: Je höher die Apoptoserate, desto höher ist die Viruslast.

Die Patientenbasisdaten und die einzelnen Ergebnisse zu dieser Abbildung sind systematisch in der Tabelle 4.1.3.1. auf den Seiten 60-61 dargestellt.

4.2.3.5. Korrelation der Apoptoserate in Lymphknoten mit der Viruslast im Blut

HIV-infizierte Zellen können der Apoptose zum Opfer fallen. Deswegen wurde der Zusammenhang zwischen der Apoptose im Lymphknoten und der Viruslast im Blut untersucht.

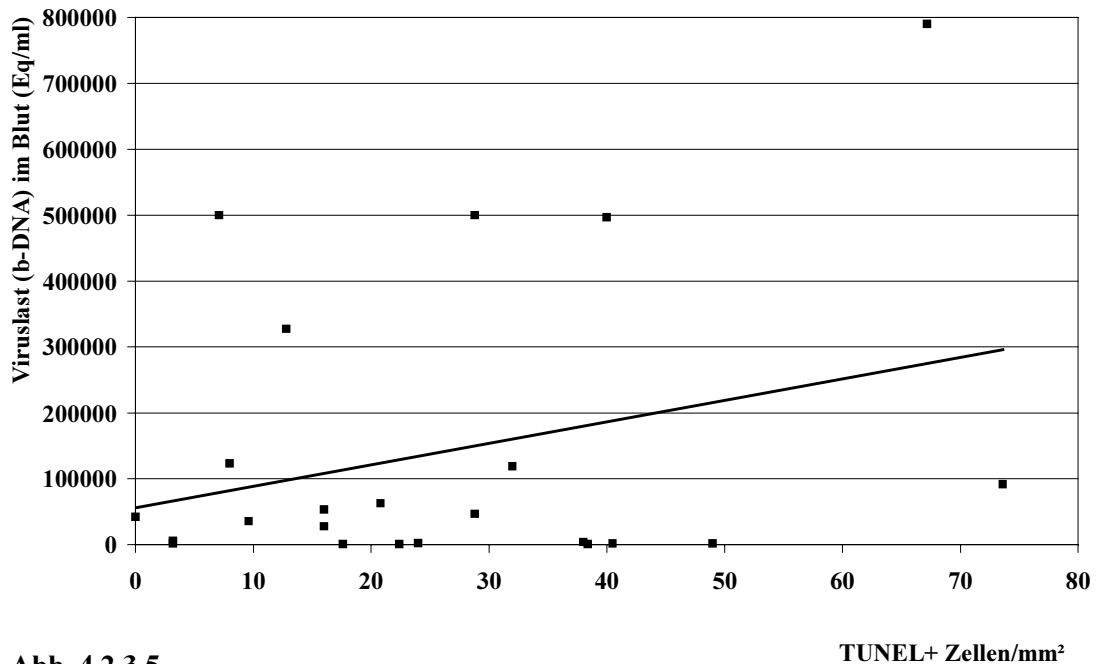


Abb. 4.2.3.5.

Die Abbildung zeigt die apoptotischen Zellen/mm² im Lymphknotenschnitt im Verhältnis zur Viruslast im peripheren Blut. Jeder Punkt im Schaubild entspricht einem Patienten; die Apoptoserate ist auf der x-Achse aufgetragen, die Viruslast im peripheren Blut zur Zeit der Lymphknotenexstirpation auf der y-Achse. Untersucht wurden Paraffinschnitte von 25 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne Interleukin-2 erhielten.

Es zeigt sich eine schwache Korrelation ($r=0,288$) der Apoptoserate in Lymphknoten mit der Viruslast im peripheren Blut: Je höher die Apoptoserate, desto höher ist die Viruslast.

Die Patientenbasisdaten und die einzelnen Ergebnisse zu dieser Abbildung sind systematisch in der Tabelle 4.1.3.1. auf den Seiten 60-61 dargestellt.

4.2.4. Apoptose in Lymphknoten bei Patienten unter IL-2 Therapie

4.2.4.1. Apoptose von Lymphozyten in Lymphknoten vor und nach 6 (bzw. 24) Monaten unter IL-2 Therapie bei 5 Patienten

Die folgenden Abbildungen (4.2.4.1.1. - 4.2.4.1.4.) zeigen 5 HIV-positive Patienten, denen ein Lymphknoten vor der IL-2 Therapie und nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie (bei einem Patienten noch zusätzlich nach 24 Monaten unter IL-2 Therapie) entnommen wurde. Auf der x-Achse sind die 5 Patienten aufgetragen, jeweils vor und nach 6 (bzw. 24) Monaten unter IL-2 Therapie. Die Anzahl der TUNEL+ (apoptotischen) Zellen pro mm² Lymphknotenschnitt sind auf der y-Achse aufgetragen. Dargestellt ist die apoptotische Gesamtpopulation an Lymphozyten und die apoptotischen CD4-, CD8- und CD57-Zellen.

Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse der Apoptose in Lymphknoten vor und nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie findet sich in Tabelle 4.1.4.1. auf der Seite 62. Die Basisdaten der Patienten finden sich in der Tabelle 4.1.4.3. auf der Seite 64.

Die Abbildung 4.2.4.1.1. zeigt die Apoptose der Gesamtlymphozytenzahl im

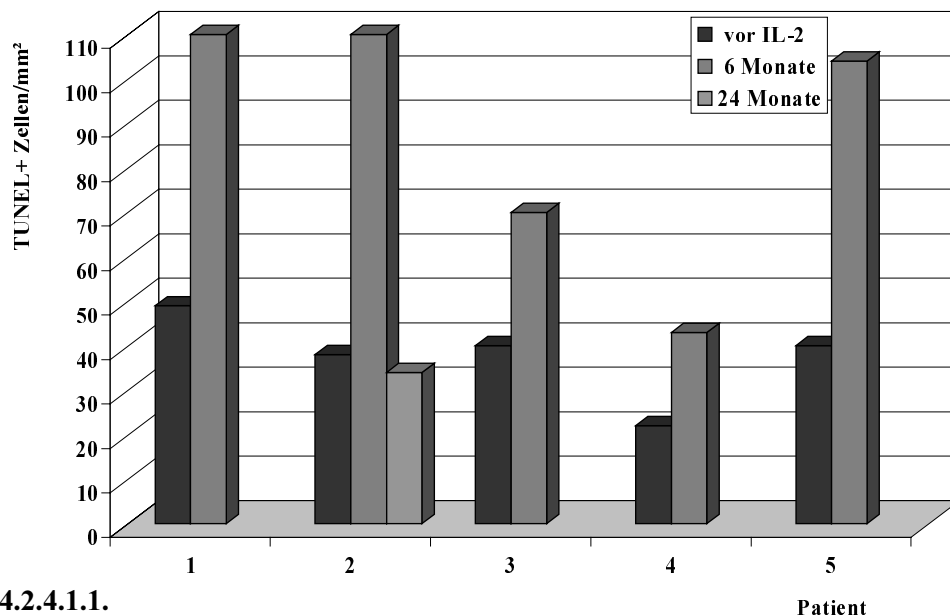


Abb. 4.2.4.1.1.

Lymphknoten. Man erkennt eine deutliche Steigerung der apoptotischen Gesamtlymphozytenzahl unter 6 Monaten IL-2 Therapie. Nach 24 Monaten unter IL-2

Therapie zeigte sich bei Patient 2 wieder eine Angleichung der Apoptoserate auf Werte wie vor Beginn der IL-2 Therapie.

In der Abbildung 4.2.4.1.2. ist die Apoptose der CD4-Zellen im Lymphknoten unter

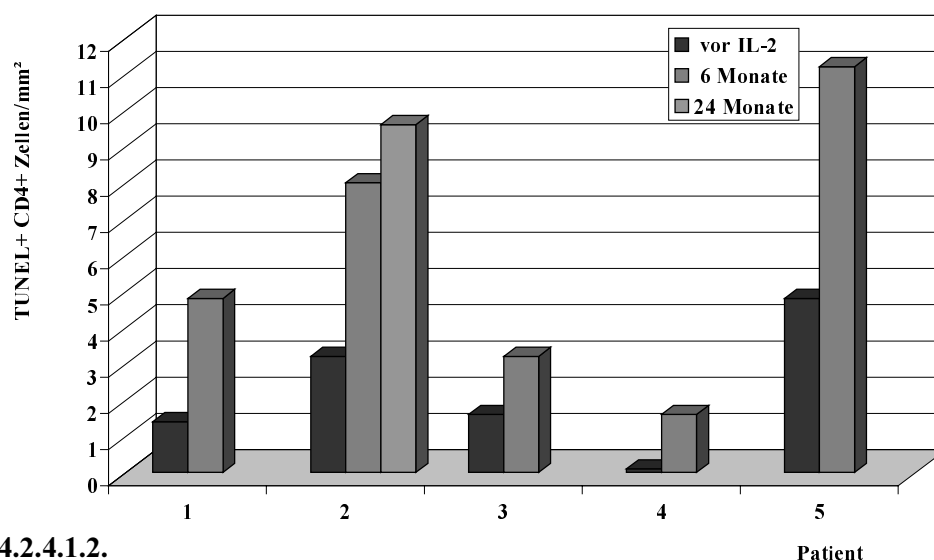


Abb. 4.2.4.1.2.

IL-2 Therapie dargestellt. Auch hier ist die deutliche Steigerung der Apoptoserate unter dem Einfluß von IL-2 zu erkennen.

In der Abbildung 4.2.4.1.3. erkennt man den Anstieg der Apoptoserate der CD8-Zellen im Lymphknoten unter IL-2 Therapie. Auch hier zeigte sich bei Patient 2 wieder eine

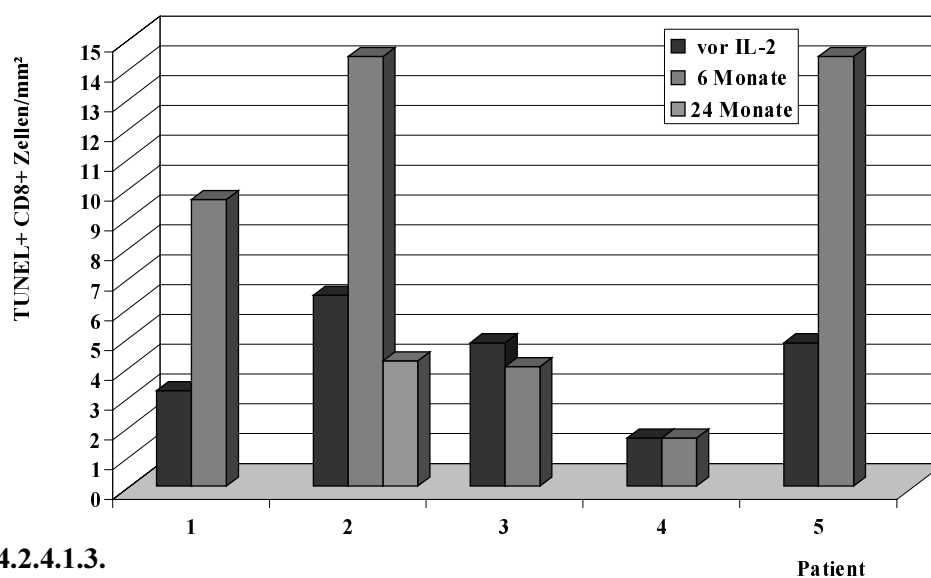


Abb. 4.2.4.1.3.

Angleichung der Apoptoserate nach 24 Monaten unter IL-2 Therapie auf die Werte vor Beginn der IL-2 Therapie.

Die Abbildung 4.2.4.1.4. zeigt die Apoptose der CD57-Zellen im Lymphknoten unter

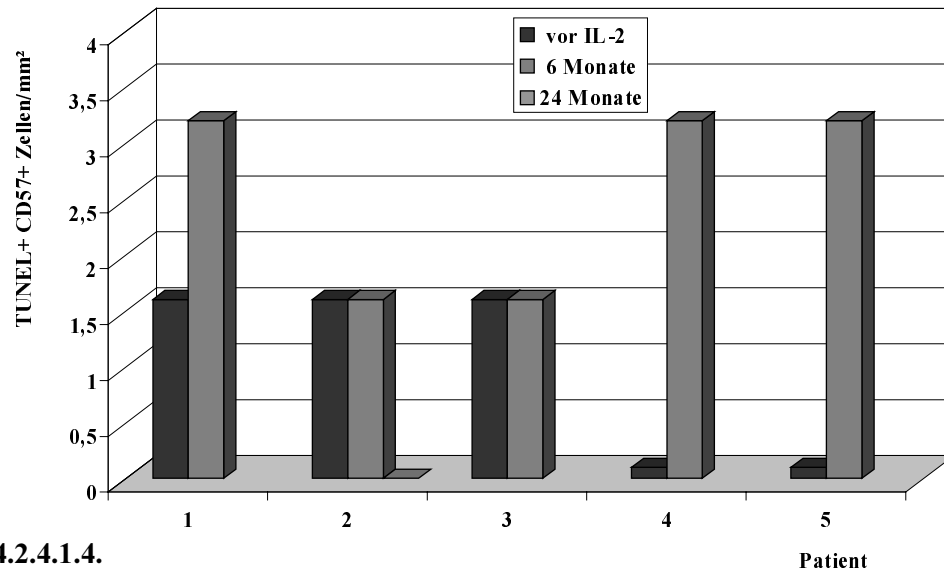


Abb. 4.2.4.1.4.

IL-2 Therapie. Man erkennt auch hier wieder den proapoptotischen Einfluß von IL-2 auf die natürlichen Killerzellen.

Abbildung 4.2.4.1.5. zeigt die durchschnittliche Apoptoserate der Lymphozytenpopulationen aller 5 Patienten vor und nach 6 Monaten unter IL-2

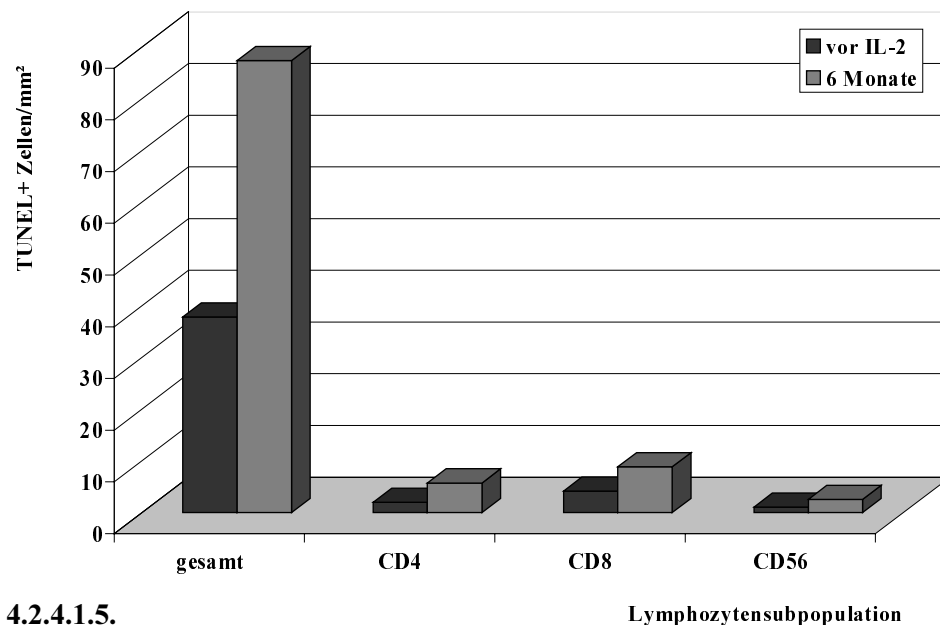


Abb. 4.2.4.1.5.

Lymphozytensubpopulation

Therapie. In den 5 Lymphknoten fand sich nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie ein deutlicher Anstieg der TUNEL-positiven (apoptotischen) Gesamtlmphozyten um das 2,3-fache (Anstieg von 37,8 auf 87,4 TUNEL+ Zellen/mm²). Die Anzahl der apoptotischen CD4-Zellen stieg um das 3-fache (Anstieg von 1,9 auf 5,7 TUNEL+CD4+ Zellen/mm²), die apoptotischen CD8-Zellen zeigten eine Erhöhung

um das 2,1-fache (Anstieg von 4,1 auf 8,8 TUNEL+CD8+ Zellen/mm²) und die CD57-Zellen um das 2,5-fache (Anstieg von 1 auf 2,5 TUNEL+CD57+ Zellen/mm²). Zu beachten ist aber, daß die quantitative Menge der apoptotischen Zellen im Vergleich zu den proliferierenden Zellen im Lymphknoten (Kapitel 4.3.2.) deutlich geringer ist. Auffällig ist hier, daß die Menge der apoptotischen Gesamtlymphozyten größer ist als die Menge der T-Zellsubpopulationen zusammen. Die Differenz der Gesamtlymphozytenzahl zu den T-Zellsubpopulationen ist wahrscheinlich auf die große Anzahl von B-Zellen (CD20, CD23) zurückzuführen, die vor allem in den Keimzentren der Lymphknoten lokalisiert sind. Es ist anzunehmen, daß nicht nur die T-Zellen, sondern auch die B-Zellen der Apoptose unterliegen.

4.2.4.2. Abbildungen apoptotischer T-Lymphozytensubpopulationen im Lymphknoten

Im folgenden sind beispielhaft Fotos der angefärbten Lymphknotenschnitte des Patienten SCJ vor Beginn der IL-2 Therapie, nach 6 und 24 Monaten unter IL-2 Therapie dargestellt (siehe Kapitel 4.2.4.1.). Es handelt sich hierbei um die Lymphknoten, die mittels der TUNEL-Methode auf Apoptose untersucht wurden. Gezeigt werden die Einfachfärbungen und die Doppelfärbungen zur Darstellung der apoptotischen Lymphozytensubpopulationen. TUNEL+ (apoptotische) Zellen haben eine gelbbraune Kernfärbung erhalten, die Lymphozytensubpopulationen (CD4, CD8, CD57) sind mittels APAAP-Methode an der Membran rot gefärbt. Man erkennt auf der linken Seite die Schnitte vor IL-2 Therapie (0 Monate), in der Mitte und auf der rechten Seite die Lymphknoten nach 6 bzw. 24 Monaten unter IL-2 Therapie, jeweils in zwei verschiedenen Vergrößerungen (50x und 400x). Zur besseren Vergleichbarkeit sind zu den entsprechenden Zeitpunkten (0, 6, 24 Monate) jeweils dieselben Areale aus dem Lymphknoten bei allen Färbungen dargestellt. Die Pfeile markieren beispielhaft die einfach bzw. doppeltgefärbten Zellen:

- ➔ einfach gefärbte Zellen, nur TUNEL+, entspricht einer apoptotischen Zelle
- ➡ doppelt gefärbte Zellen, TUNEL+ und Lymphozyten (CD-) Antikörper+ entspricht einer apoptotischen CD4-, CD8- oder CD57-Zelle
- ▶ einfach gefärbte Zellen, nur Lymphozyten (CD-) Antikörper+ entspricht einer CD4-, CD8- oder CD57-Zelle, nicht apoptotisch

TUNEL

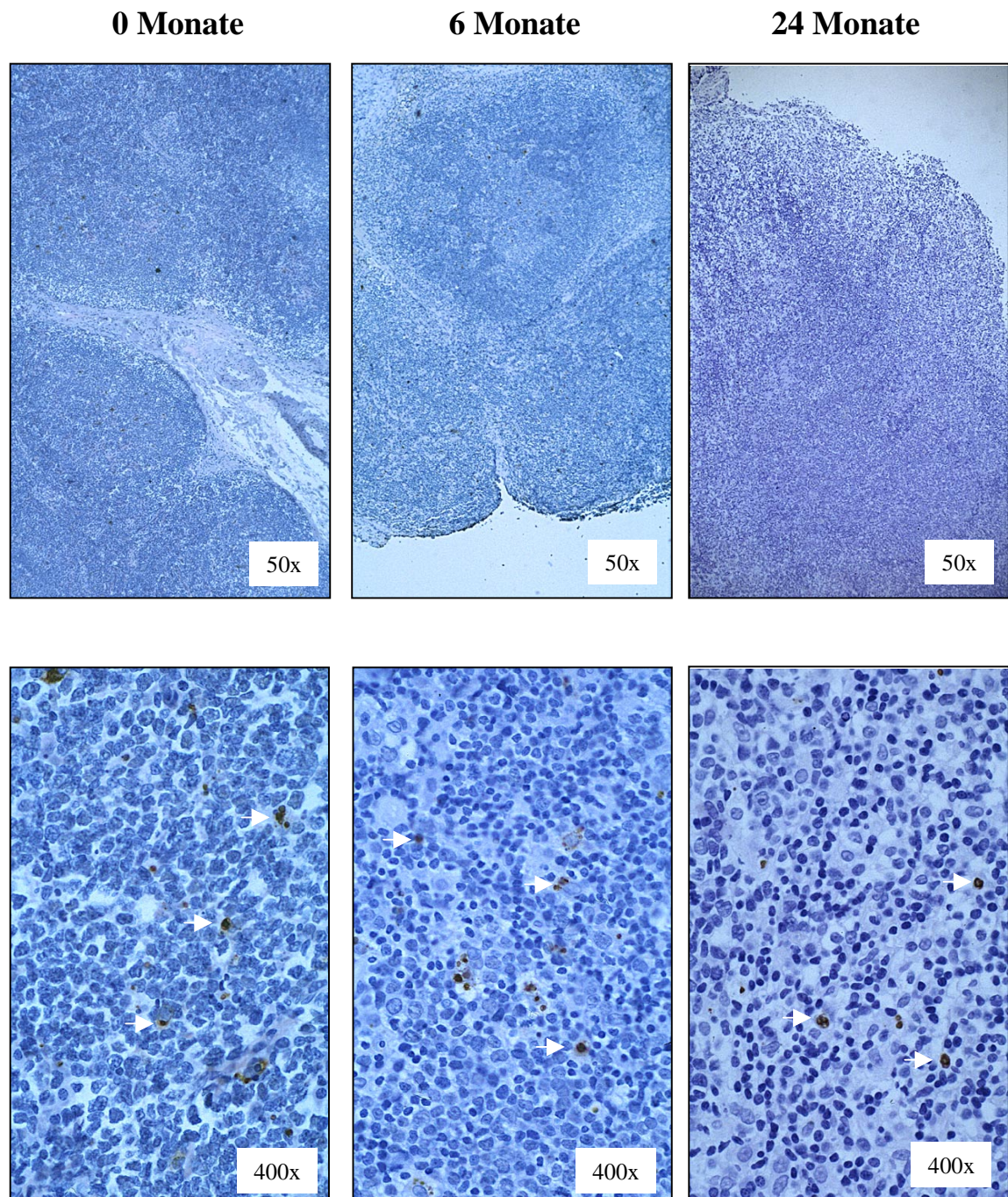


Abb. 4.2.4.2.1. Einfachfärbung mit der TUNEL-Methode

TUNEL/CD4

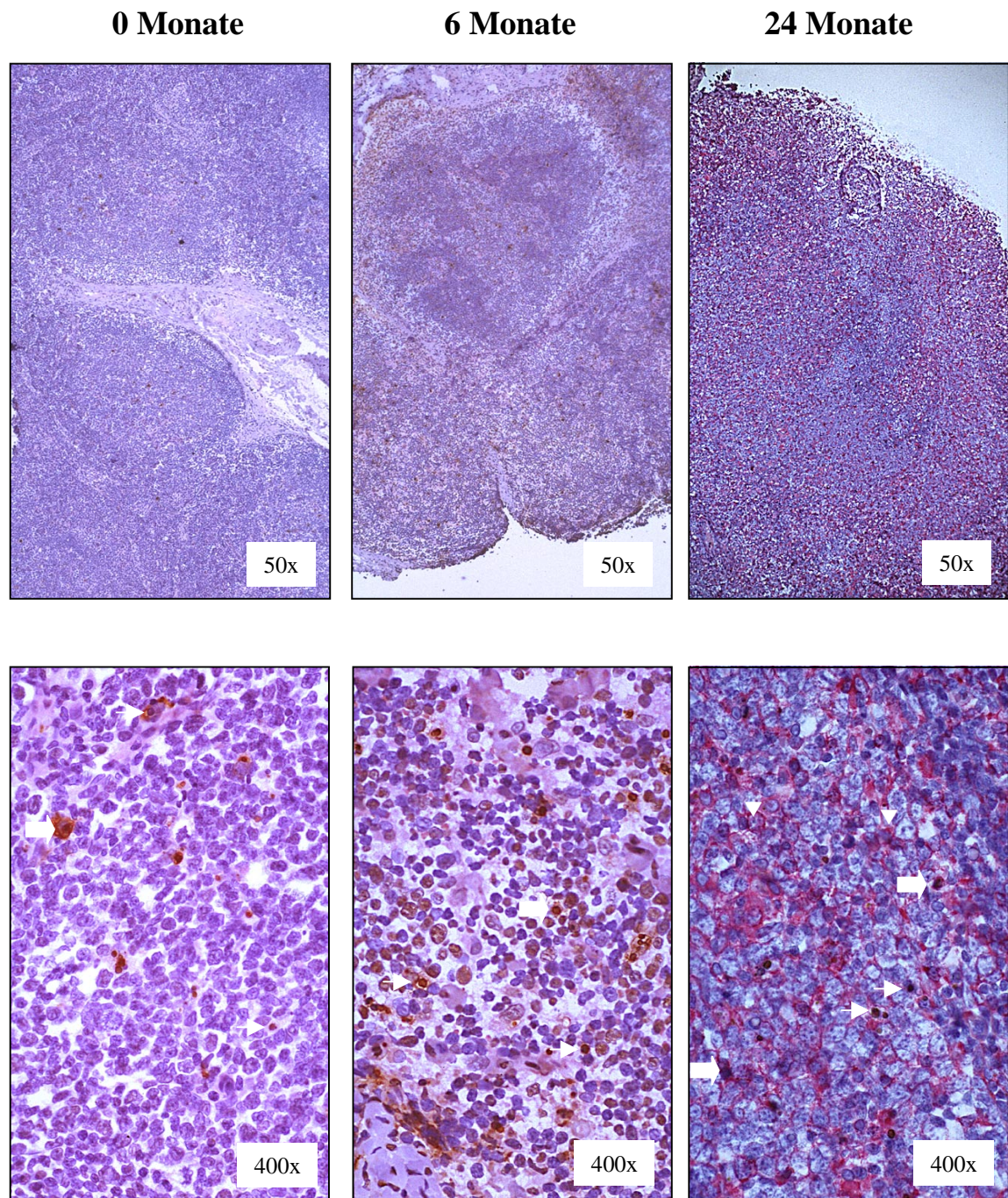


Abb. 4.2.4.2.2. Doppelfärbung mit TUNEL/CD4

TUNEL/CD8

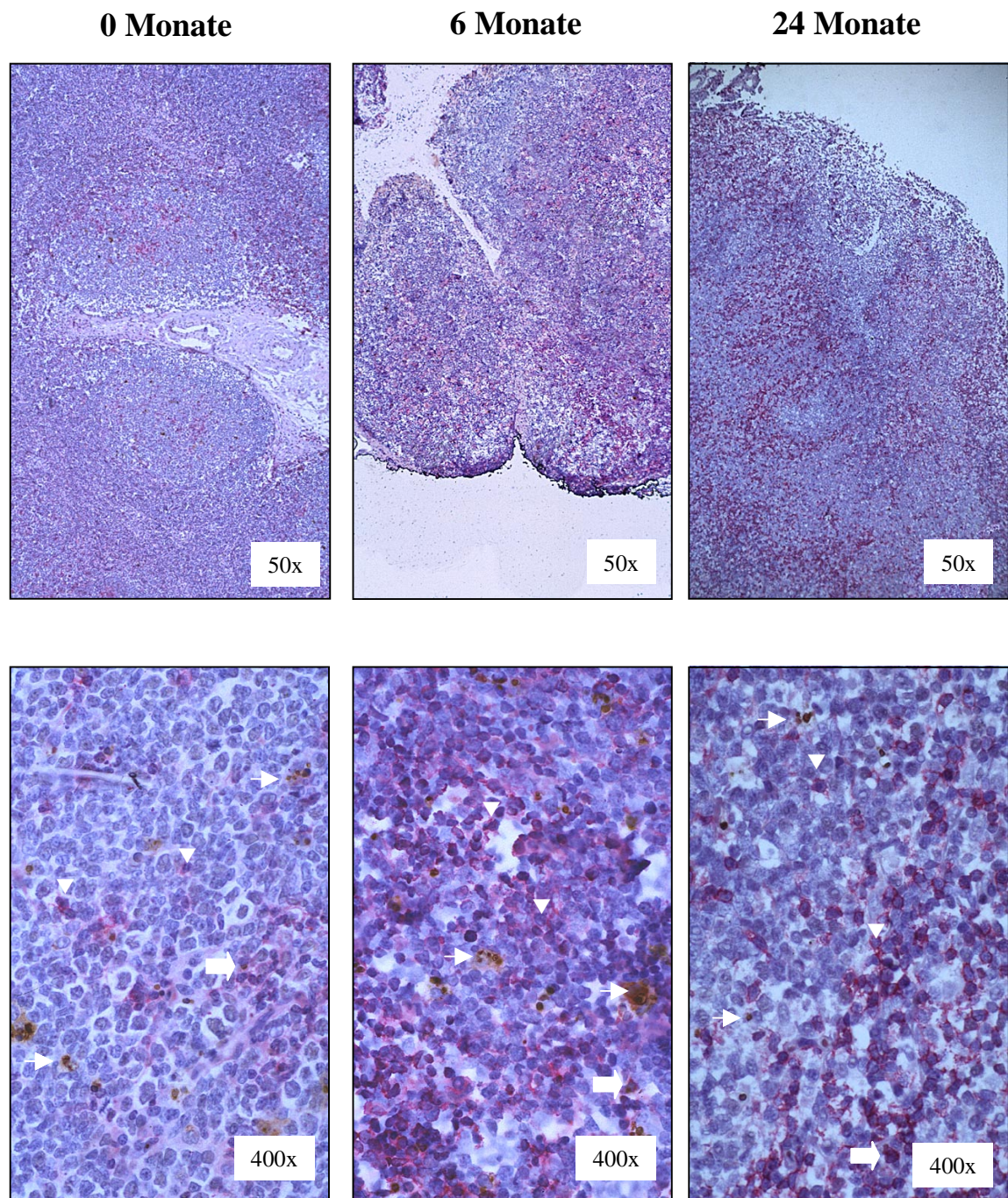


Abb. 4.2.4.2.3. Doppelfärbung mit TUNEL/CD8

TUNEL/CD57

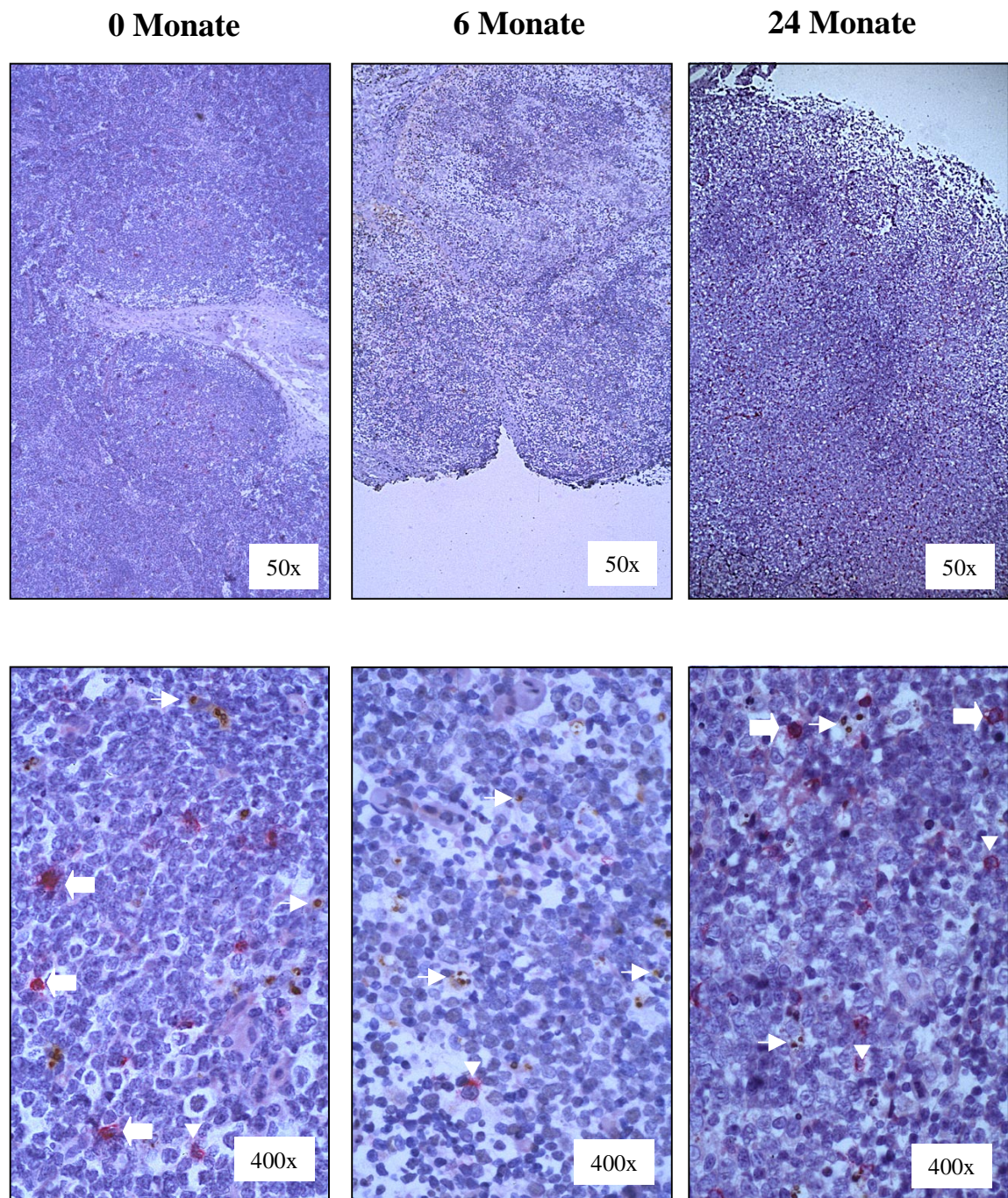


Abb. 4.2.4.2.4. Doppelfärbung mit TUNEL/CD57

4.3. Proliferation

4.3.1. Proliferation in peripheren Blutlymphozyten bei Patienten unter IL-2 Therapie

4.3.1.1. Verlauf der Proliferation in peripheren Blutlymphozyten während des IL-2 Zyklus bei 11 Patienten

Nach Bestimmung der Apoptose sind im folgenden die Untersuchungsergebnisse dargestellt, die den Einfluß subkutaner Interleukin-2 Gabe auf die Proliferation von verschiedenen Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut bei HIV-positiven Patienten aufzeigen.

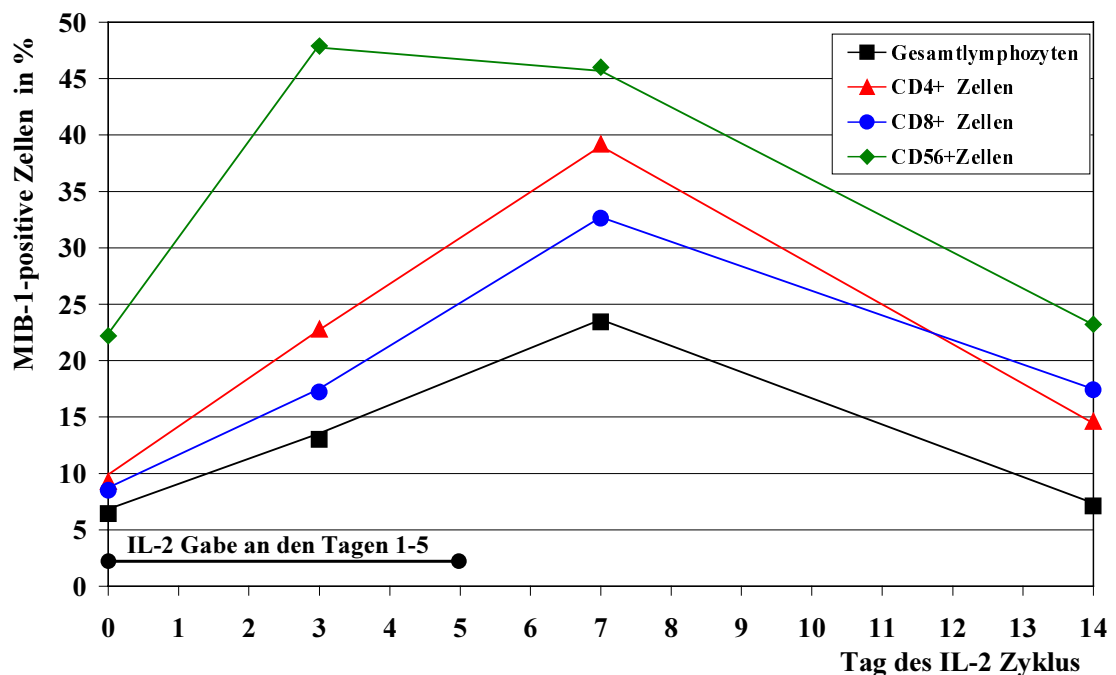


Abb. 4.3.1.1.

Die Abbildung 4.3.1.1. zeigt die Proliferation der Lymphozyten im peripheren Blut während eines IL-2 Zyklus (jeweils 3. oder 4. IL-2 Zyklus) bei 11 HIV-positiven Patienten, davon 2 Patienten im Stadium A2-3, 7 Patienten im Stadium B1-3 und 2 Patienten im Stadium C3 (nach der CDC/WHO-Klassifikation [18]). Die Messungen erfolgten zu den Zeitpunkten vor Beginn (Tag 0) des neuen IL-2 Zyklus, sowie zu den Zeitpunkten Tag 3, 7 und 14 nach Beginn des IL-2 Zyklus (IL-2 Injektionen an den Tagen 1-5). Auf der x-Achse sind die entsprechenden Zeitpunkte aufgetragen, auf der

y-Achse die prozentuale Häufigkeit der MIB-1-positiven, d.h. der proliferierenden Zellen im Blut. Untersucht wurde die Gesamtzahl der Lymphozyten und die verschiedenen Subpopulationen CD4, CD8, CD56.

Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Proliferationsrate bei allen Lymphozyten bis zum siebten Tag und ein darauffolgender Abfall der Proliferation nach zwei Wochen bis fast auf die Ausgangswerte. Auffällig ist hier der vergleichsweise schnellere Anstieg der Proliferationsrate bei den CD56-Zellen bis zum dritten Tag nach IL-2 Gabe.

Der Vergleich der Anzahl der MIB-1-positiven (proliferierenden) Lymphozyten im Blut am Tag 0 und am Tag 7 (bzw. Tag 3 bei CD56) zeigt eine Erhöhung der

- MIB-1+ Gesamt-Lymphozyten um den Faktor **3.65** (\emptyset 6,4% [\pm 2,7] vs. \emptyset 23,4% [\pm 12,0]).
- MIB-1+ CD4+-Lymphozyten um den Faktor **4.21** (\emptyset 9,3% [\pm 4,1] vs. \emptyset 39,2% [\pm 18,0]).
- MIB-1+ CD8+-Lymphozyten um den Faktor **3.83** (\emptyset 8,5% [\pm 5,1] vs. \emptyset 32,6% [\pm 19,9]).
- MIB-1+ CD56+-Lymphozyten um den Faktor **2.15** (\emptyset 22,2% [\pm 10,7] vs. \emptyset 47,9% [\pm 15,2]).

Eine detaillierte und systematische Zusammenfassung aller Meßergebnisse und die Basisdaten der Patienten finden sich am Anfang des Kapitels in den Tabellen 4.1.2.1. und 4.1.2.2. auf den Seiten 55-59.

4.3.1.2. Relative Proliferation der CD4- und CD8-Zellen im peripheren Blut während des IL-2 Zyklus (Tag 0 und Tag 7) bei 11 Patienten

Zur Darstellung der relativen Proliferationsrate der CD4- und CD8-Zellen wurde der Anteil proliferierender CD4- und CD8-Zellen an der Gesamtheit der jeweiligen Lymphozytensubpopulation korreliert.

Die Abbildungen zeigen die relative Proliferation der Lymphozyten im peripheren Blut während

des IL-2 Zyklus bei 11 HIV-positiven Patienten. Die Blutentnahmen erfolgten einen Tag vor Beginn (Tag 0) des neuen IL-2 Zyklus, sowie

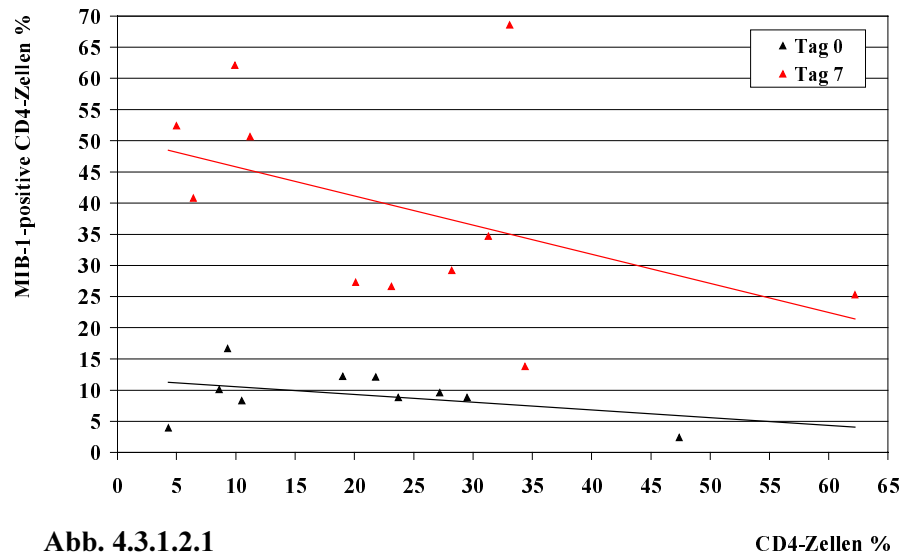


Abb. 4.3.1.2.1

zu den Zeitpunkten Tag 3, 7 und 14 nach Beginn des Zyklus (IL-2 Gabe an den Tagen 1-5). Dargestellt sind hier der Tag 0 und Tag 7 als Zeitpunkt der größten Proliferationsrate. Mit Hilfe des Durchflußzytometers wurden die Lymphozytensubpopulationen aus peripherem Venenblut gemessen. Auf der x-Achse ist der prozentuale Anteil der CD4-Zellen und CD8-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl aufgetragen. Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil der MIB-1 positiven, d.h. der proliferierenden CD4- und CD8-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl aufgetragen. Schwarze Symbole entsprechen den Werten zum Zeitpunkt Tag 0, die farbigen Symbole geben die Daten zum Zeitpunkt Tag 7 wieder.

Die Wachstumsfraktionen der CD4-Zellen (MIB-1 positiv) korrelierten invers mit der relativen CD4-Zellzahl sowohl vor Beginn des neuen IL-2 Zyklus (Tag 0), als auch verstärkt am Tag 7 (2. Tag nach IL-2 Gabe). Dies zeigt, daß geringe CD4-Zellzahlen mit einer ansteigenden Proliferation (verstärkte Expression des Ki-67) der CD4-Zellen

einhergehen. Auch nach IL-2 Gabe (Tag 7) scheint sich dieser Trend zu verstärken.

Vor allem die

Patienten mit

einem relativ

niedrigen

prozentualen

Anteil an

CD4-Zellen

zeigten unter

IL-2 Gabe

einen höheren

Anteil an

proliferieren-

den CD4-Zellen (Abb. 4.3.1.2.1.).

Dahingegen zeigte die Wachstumsfraktion der CD8-Zellen (MIB-1 positiv) keine bzw. kaum eine Korrelation mit der relativen Zahl der CD8-Zellen, weder am Tag 0 noch am Tag 7 (Abb. 4.3.1.2.2.).

Bei allen Abbildungen zeigte sich am Tag 7 im Vergleich zum Tag 0 ein deutlicher Anstieg des prozentualen Anteils der proliferierenden Lymphozytensubpopulationen.

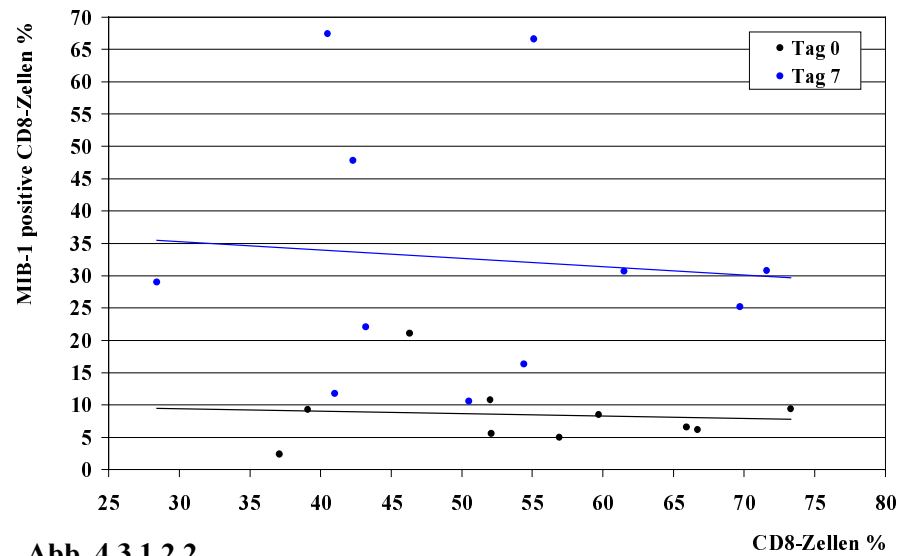


Abb. 4.3.1.2.2.

4.3.1.3. Korrelation der Wachstumsfraktion der CD4-Zellen zur Wachstumsfraktion der CD8-Zellen im peripheren Blut bei 11 Patienten unter IL-2 Therapie

Zur Darstellung der Wirkung von IL-2 auf die CD4- und CD8-Zellen wurden die Wachstumsfraktionen der beiden Zellreihen miteinander korreliert.

Die Abbildung 4.3.1.3.1. zeigt die Proliferation der Lymphozyten im peripheren Blut während des IL-2 Zyklus bei 11 HIV-positiven

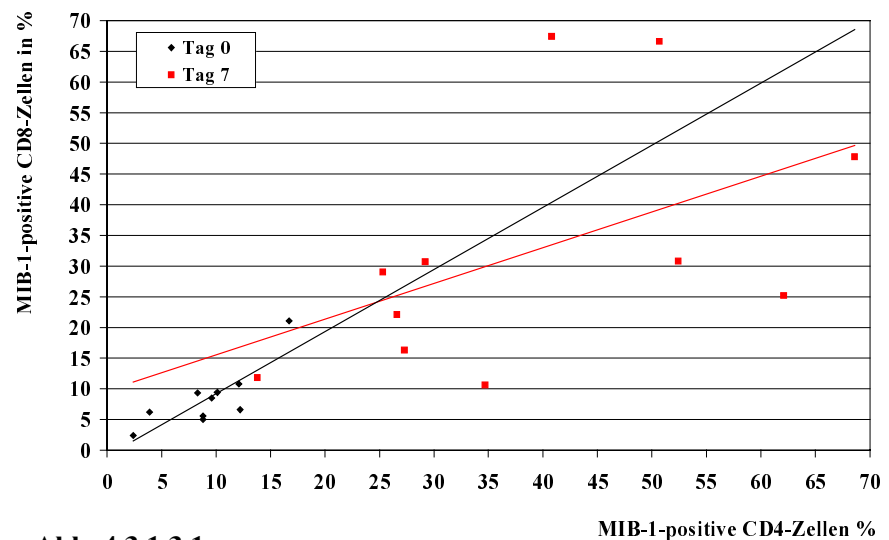


Abb. 4.3.1.3.1.

Patienten. Die Blutentnahmen erfolgten einen Tag vor Beginn (Tag 0) des neuen IL-2 Zyklus, sowie zu den Zeitpunkten Tag 3, 7 und 14 nach Beginn des Zyklus (IL-2 Gabe an den Tagen 1-5). Dargestellt sind hier der Tag 0 und Tag 7 als Zeitpunkt der größten Proliferationsrate. Mit Hilfe des Durchflußzytometers wurden die Lymphozytensubpopulationen aus peripherem Venenblut gemessen. Auf der x-Achse sind die MIB-1-positiven, d.h. die proliferierenden CD4-Zellen aufgetragen. Auf der y-Achse sind die MIB-1-positiven CD8-Zellen aufgetragen. Schwarze Symbole entsprechen den Werten zum Zeitpunkt Tag 0, die roten Symbole geben die Daten zum Zeitpunkt Tag 7 wieder.

Es zeigte sich eine deutliche positive Korrelation zwischen der Wachstumsfraktion der CD4-Zellen (MIB-1 positiv) mit der Wachstumsfraktion der CD8-Zellen (Abb. 4.3.1.3.1.) sowohl am Tag 0 als auch am Tag 7. Dies zeigt, daß die Proliferation in den untersuchten Lymphozytensubpopulationen parallel ausgeprägt ist und daß IL-2 die Proliferation der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen unspezifisch und parallel steigert.

4.3.2. Proliferation in Lymphknoten bei HIV-Patienten unter IL-2 Therapie

4.3.2.1. Proliferation von Lymphozyten in Lymphknoten vor und nach 6 (bzw. nach 24) Monaten unter IL-2 Therapie bei 5 Patienten

Die folgenden Abbildungen (4.3.2.1.1. - 4.3.2.1.5) zeigen 5 HIV-positive Patienten, denen ein Lymphknoten vor Beginn der IL-2 Therapie und nach 6 (bzw. nach 24) Monaten unter IL-2-Therapie entnommen wurde. Auf der x-Achse sind die 5 Patienten aufgetragen, jeweils vor und 6 (bzw. 24) Monate unter IL-2 Therapie. Die Anzahl der MIB-1-positiven (proliferierenden) Zellen pro mm² Lymphknotenschnitt sind auf der y-Achse aufgetragen. Dargestellt ist die proliferierende Gesamtpopulation an Lymphozyten und die proliferierenden CD4-Zellen, CD-8-Zellen und die CD57-Zellen.

Die Anzahl der proliferierenden Zellen im Lymphknoten ist im Vergleich zu der Anzahl der apoptotischen Zellen im Lymphknoten (Kapitel 4.2.4.) quantitativ um das 10-20-fache deutlich höher (Tabellen 4.1.4.1. und 4.1.4.2. auf den Seiten 62-63).

Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse der Proliferation im Lymphknoten vor und nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie findet sich in Tabelle 4.1.4.2. auf der Seite 63. Die Basisdaten der Patienten finden sich in der Tabelle 4.1.4.3. auf der Seite 64.

Die Abbildung 4.3.2.1.1. zeigt die Proliferation der Gesamtlymphozytenzahl im Lymphknoten.

Man erkennt eine deutliche Steigerung der proliferierenden Gesamtlymphozyten nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie. Auch

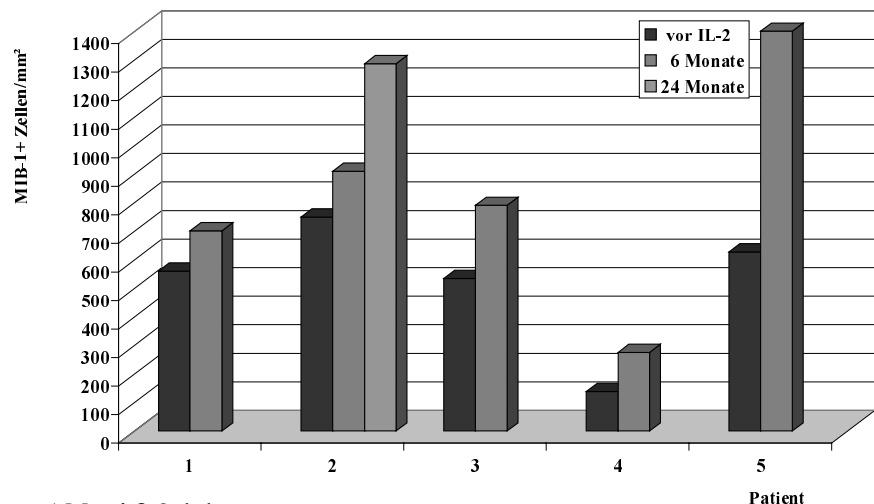


Abb. 4.3.2.1.1.

nach 24 Monaten unter IL-2 Therapie zeigte sich bei Patient 2 eine nochmalige Zunahme der proliferierenden Zellen.

Die Abbildung 4.3.2.1.2. zeigt die Proliferation der CD4-Zellen im Lymphknoten. Auch hier erkennt man die Zunahme der Zellzahl nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie.

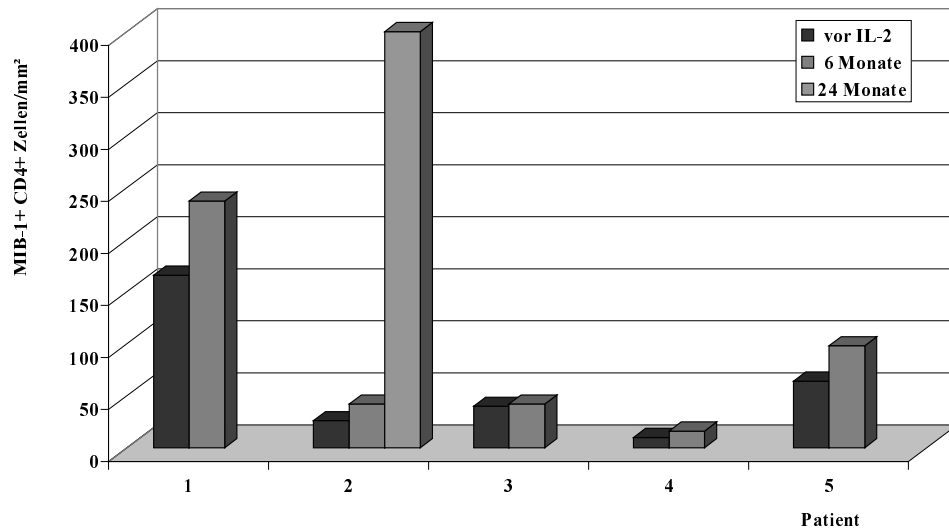


Abb. 4.3.2.1.2.

Besonders auffällig war hier der starke Anstieg der proliferierenden CD4-Zellen nach 24 Monaten unter IL-2 Therapie bei Patient 2.

Die Abbildung 4.3.2.1.3. zeigt die Proliferation der CD8-Zellen im Lymphknoten. Man erkennt die deutliche Steigerung der Anzahl der proliferierenden Suppressor-

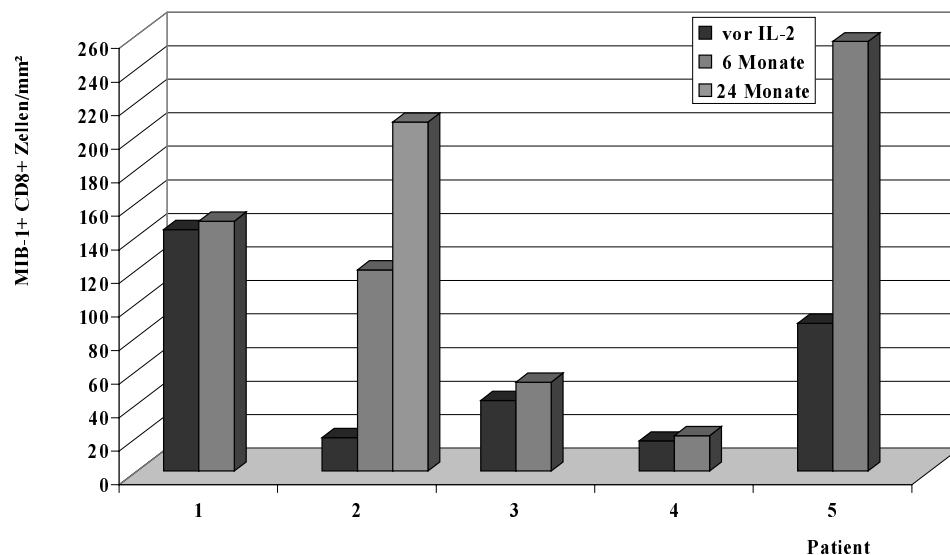


Abb. 4.3.2.1.3.

zellen nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie. Dieser Effekt war bei den Patienten 2 und 5 am stärksten ausgeprägt, wobei Patient 2 auch nach 24 Monaten unter IL-2 Therapie eine nochmalige Steigerung der Proliferationsrate aufwies.

In Abbildung 4.3.2.1.4. ist die Proliferation der CD57-Zellen im Lymphknoten dargestellt. Auch hier ist die Zunahme der proliferierenden natürlichen Killerzellen

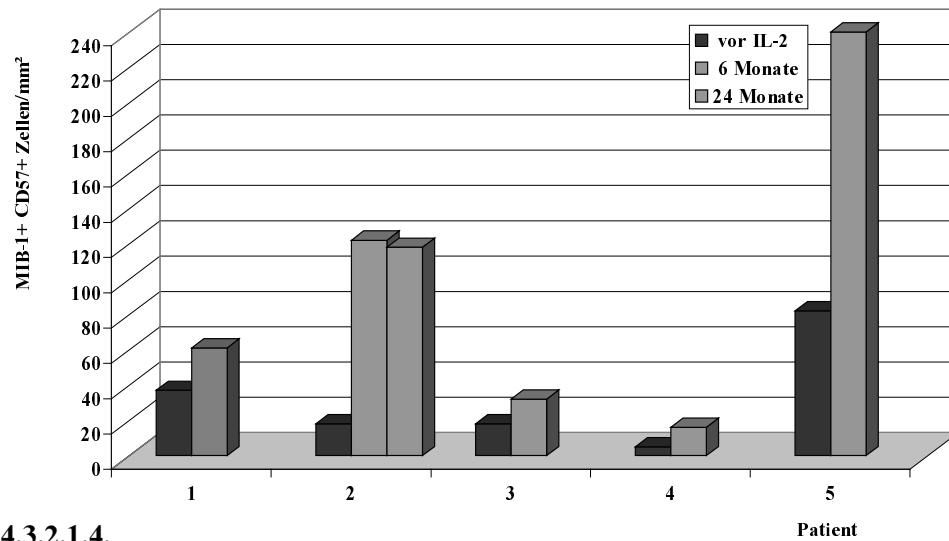


Abb. 4.3.2.1.4.

nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie zu erkennen. Nach 24 Monaten unter IL-2 Therapie zeigt sich bei Patient 2 keine weitere Proliferation der CD57-Zellen.

Abb. 4.3.2.1.5. zeigt die durchschnittliche Proliferationsrate der Lymphozyten-subpopulationen aller 5 Patienten vor und nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie.

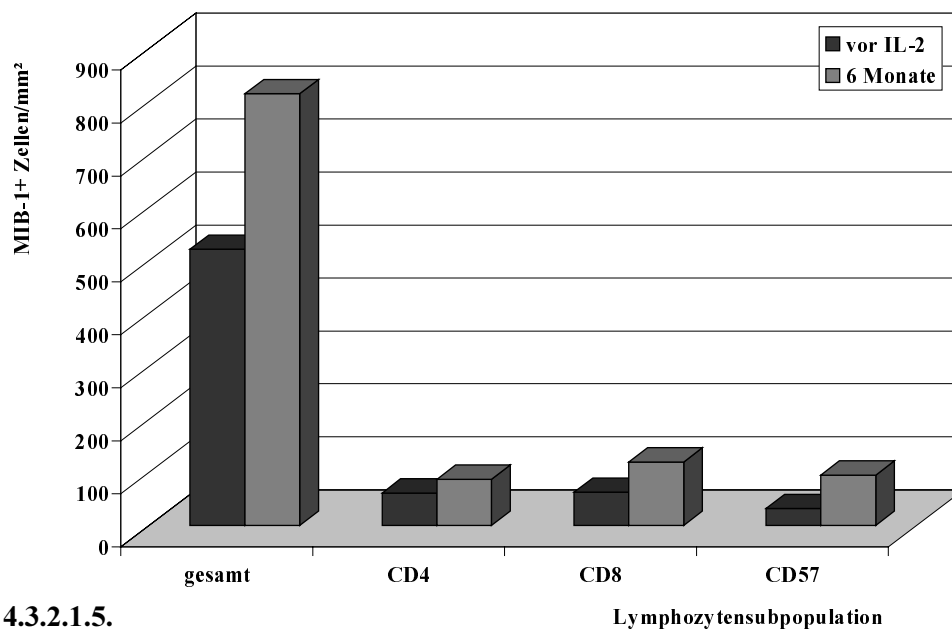


Abb. 4.3.2.1.5.

In den 5 Lymphknotenpaaren fand sich nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie ein 1,56-facher Anstieg der proliferierenden Gesamtlymphozyten (Anstieg von 521,2 auf 814,8

MIB-1+Zellen/mm²). Die proliferierenden natürlichen Killerzellen (CD57) verdreifachten sich (Anstieg von 32 auf 95,2 MIB-1+CD57+ Zellen/mm²), während die CD8-Zellen nur mäßig um das 1,9-fache (Anstieg von 62,4 auf 119,8 MIB-1+CD8+ Zellen/mm²) und die CD4-Zellen um das 1,4-fache (Anstieg von 61,2 auf 87 MIB-1+CD4+ Zellen/mm²) nicht signifikant anstiegen. Auffällig ist hier, daß die Menge der proliferierenden Gesamtlymphozyten größer ist als die Menge der proliferierenden T-Zellsubpopulationen zusammen. Die Differenz der Gesamtlymphozytenzahl zu den T-Zellsubpopulationen ist wahrscheinlich auf die große Anzahl von B-Zellen (CD20) und follikulär dendritische Zellen (CD23) zurückzuführen, die vor allem in den Keimzentren der Lymphknoten lokalisiert sind und in den Abbildungen 4.3.2.3.2. und 4.3.2.3.3. auf den Seiten 102 und 103 gezeigt werden.

4.3.2.2. Abbildungen proliferierender T-Lymphozytensubpopulationen im Lymphknoten

Im folgenden sind repräsentative Fotos von den angefärbten Lymphknotenschnitten des Patienten SCJ vor Beginn der IL-2 Therapie und nach 6 bzw. nach 24 Monaten unter IL-2 Therapie dargestellt. Es handelt sich hierbei um die Lymphknoten, die mittels des MIB-1 Antikörpers auf die Proliferation untersucht wurden. Gezeigt werden die Einfachfärbungen und die Doppelfärbungen zur Darstellung der proliferierenden Lymphozytensubpopulationen. Proliferierende Zellen haben eine schwarze Kernfärbung erhalten, die Lymphozytensubpopulationen (CD4, CD8, CD57) sind mittels APAAP-Methode an der Membran rot gefärbt. Man erkennt auf der linken Seite die Schnitte vor IL-2 Therapie, in der Mitte und auf der rechten Seite die Lymphknoten nach 6 und 24 Monaten unter IL-2 Therapie jeweils in zwei verschiedenen Vergrößerungen (50x und 400x). Zur besseren Vergleichbarkeit sind zu den entsprechenden Zeitpunkten (0, 6, 24 Monate) jeweils dieselben Areale aus dem Lymphknoten bei allen Färbungen dargestellt. Die Pfeile markieren beispielhaft die einfach bzw. doppeltgefärbten Zellen:

- ➔ einfach gefärbte Zellen, nur MIB-1-Antikörper+ (proliferierende Zelle)
- ➡ doppelt gefärbte Zellen, MIB-1+ Lymphozyten und (CD) Antikörper+ entspricht einer proliferierenden CD4-, CD8- oder CD57-Zelle
- ▶ einfach gefärbte Zellen, nur Lymphozyten (CD) Antikörper+ entspricht einer CD4-, CD8- oder CD57-Zelle, nicht proliferierend

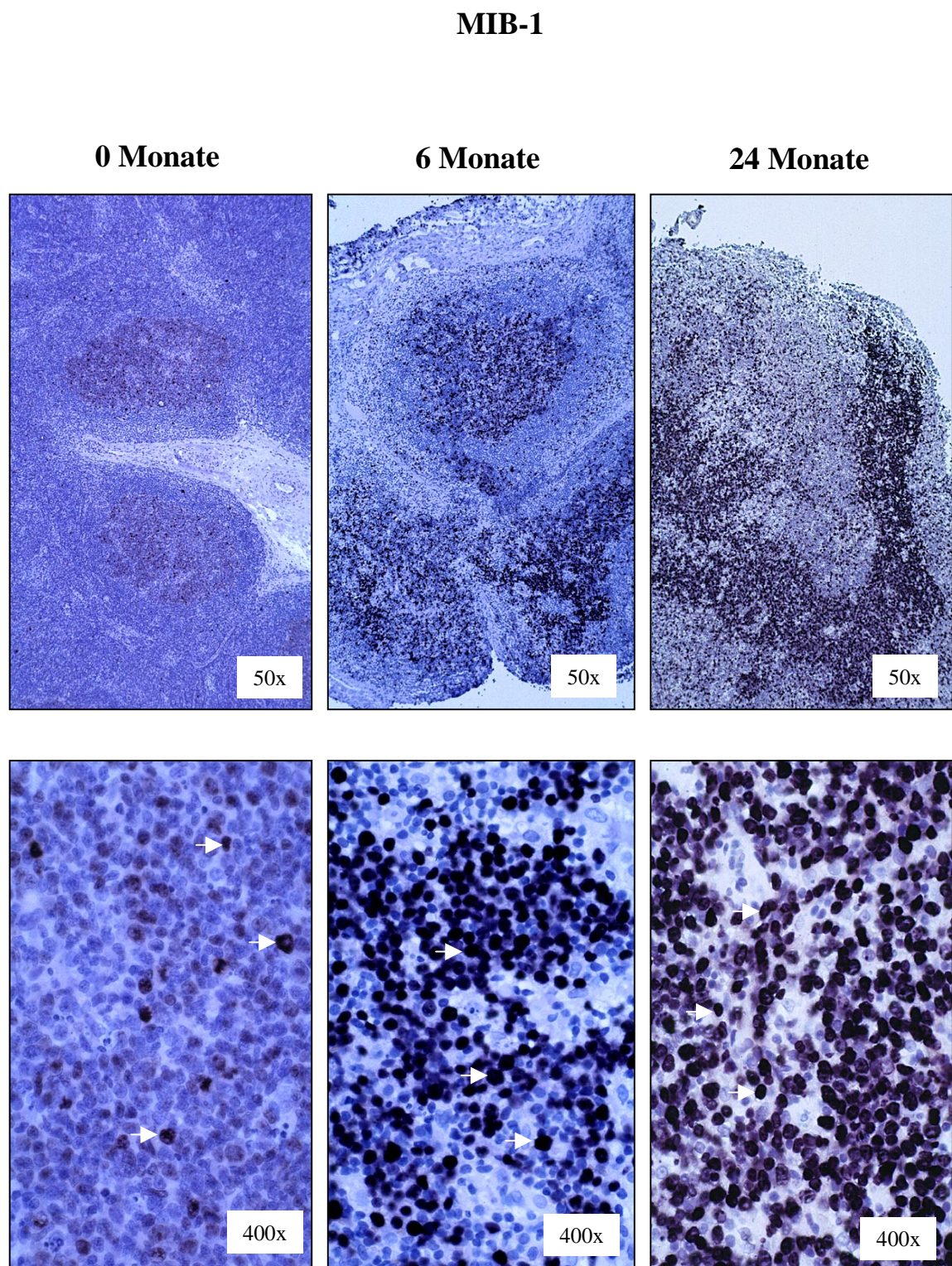
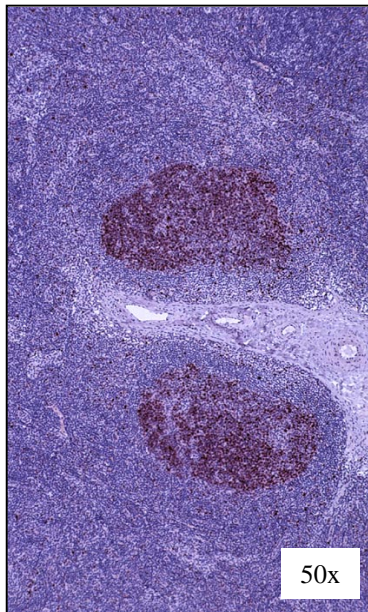


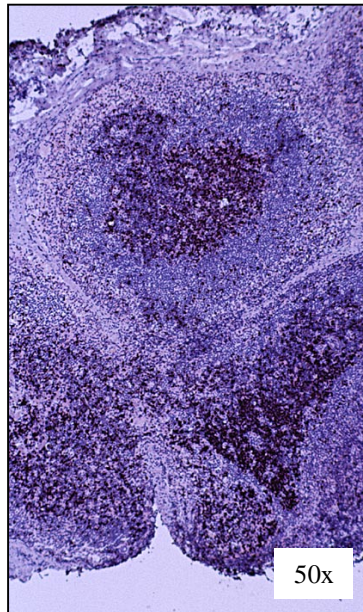
Abb. 4.3.2.2.1. Einfachfärbung mit MIB-1

MIB-1/CD4

0 Monate



6 Monate



24 Monate

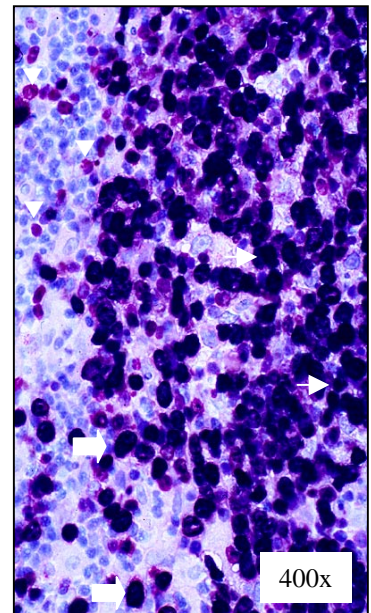
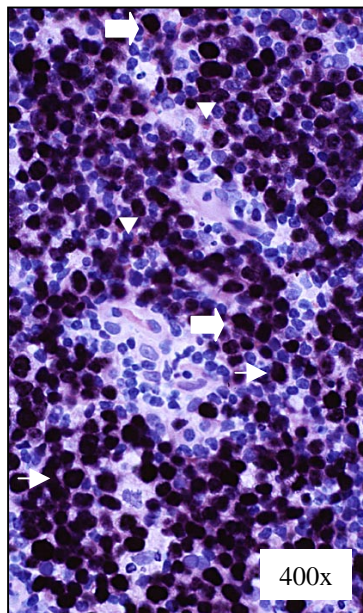
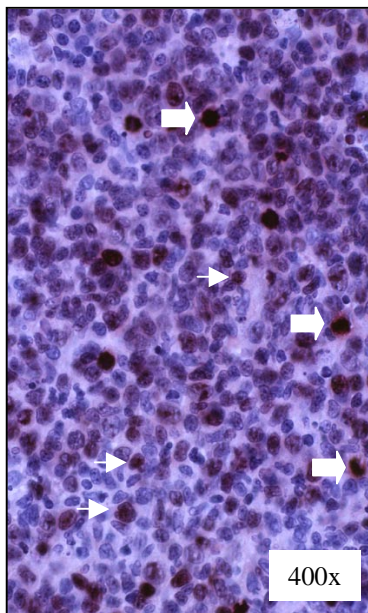
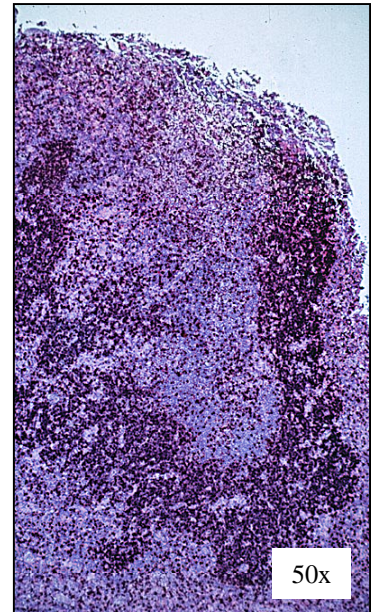


Abb. 4.3.2.2.2. Doppelfärbung mit MIB-1/CD4

MIB-1/CD8

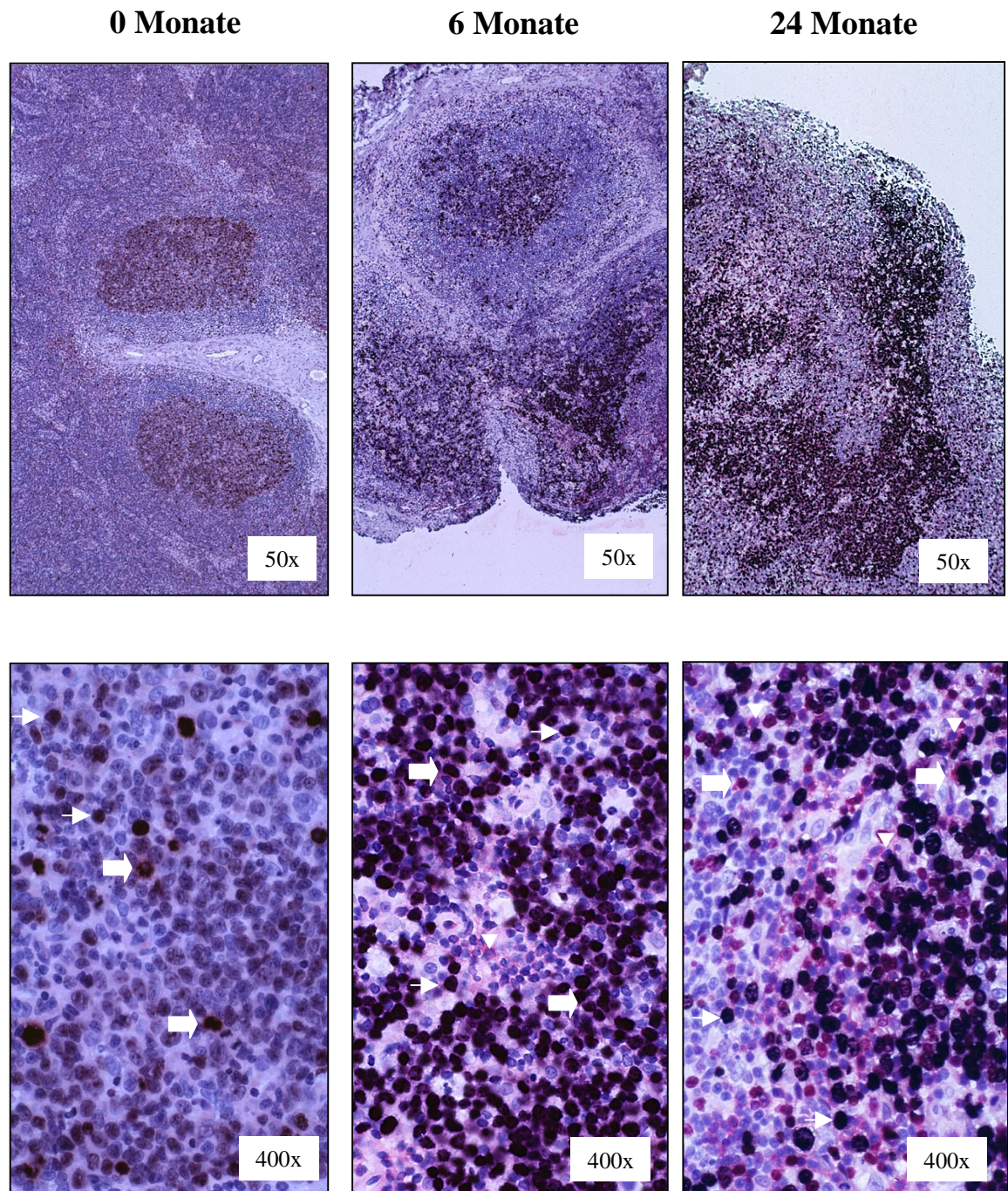


Abb. 4.3.2.2.3. Doppelfärbung mit MIB-1/CD8

MIB-1/CD57

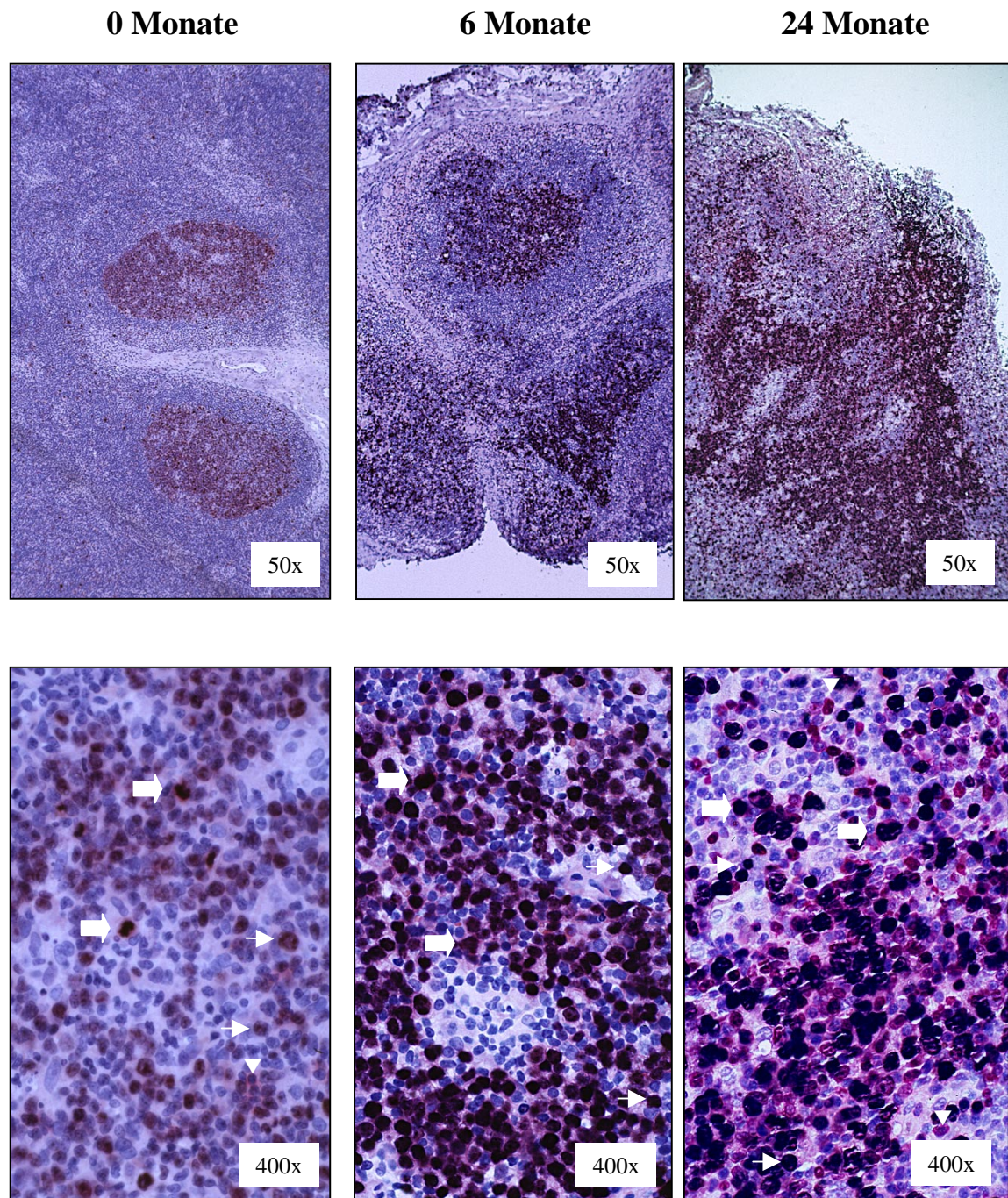


Abb. 4.3.2.2.4. Doppelfärbung mit MIB-1/CD57

4.3.2.3. Abbildungen proliferierender B-Lymphozyten und follikulär dendritischer Zellen (FDC) im Lymphknoten

Im folgenden sind repräsentative Fotos von den angefärbten Lymphknotenschnitten des Patienten FIG vor Beginn der IL-2 Therapie dargestellt. Es handelt sich hierbei um die Lymphknoten, die mittels der Antikörper gegen CD3 (T-Zellen), CD20 (B-Zellen) und CD23 (Follikulär dendritische Zellen = FDC) und MIB-1 (proliferierende Zellen) eine Einfach- bzw Doppelfärbung erhalten haben (Abbildungen 4.3.2.3.1. bis 4.3.2.3.3.). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde immer das gleiche Lymphknotenareal für die Fotos ausgewählt. Die Lymphozytensubpopulationen (CD3, CD20, CD23) sind mittels APAAP-Methode an der Membran rot gefärbt, proliferierende Zellen (MIB-1) haben eine schwarze Kernfärbung erhalten. Man erkennt in der Abbildung 4.3.2.3.1. auf der linken Seite die Monofärbung gegen CD3 und auf der rechten Seite die Monofärbung gegen Ki-67 (MIB-1). Während die T-Zellen (CD3) überwiegend im parakortikalen Bereich lokalisiert sind, finden sich die proliferierenden (MIB-1 positiven) Zellen vorwiegend im Keimzentrum. In der Abbildung 4.3.2.3.2. sind links die einfachgefärbten B-Zellen (CD20) dargestellt und rechts die doppeltgefärbten proliferierenden (MIB-1) CD20-Zellen. In der Abbildung 4.3.2.3.3. sind links die einfachgefärbten follikulär dendritischen Zellen (CD23) dargestellt und rechts die doppeltgefärbten proliferierenden (MIB-1) CD23-Zellen. In den oberen Reihen sind die Abbildungen zur besseren Übersicht in 50-facher Vergrößerung dargestellt, in der unteren Reihe finden sich detaillierte Abbildungen in 400-facher Vergrößerung.

In den Monofärbungen zeigt sich, daß B-Zellen (CD20) sowie FDC (CD23) vorwiegend in den Keimzentren der Lymphknoten lokalisiert sind, wohingegen T-Zellen (CD3) vorwiegend im parakortikalen Bereich zu finden sind. Deutlich zu erkennen ist die Proliferation der Lymphozyten in den Keimzentren. Durch die immunhistochemische Doppelfärbung ließ sich zeigen, daß die Proliferationstendenz überwiegend von den B-Zellen in den Keimzentren ausgeht und weniger von den parakortikalen T-Zellen.

Diese Befunde einer B-Zell und FDC Proliferation durch IL-2 helfen auch die Differenz zwischen der Menge der proliferierenden Gesamtlmphozyten und der proliferierenden T-Zellsubpopulationen zu erklären, welche bei der Untersuchung zur Poliferation in Lymphknoten auffiel (siehe Kapitel 4.3.2.1. auf den Seiten 92-95 und Abbildung 4.3.2.1.5. auf der Seite 94).

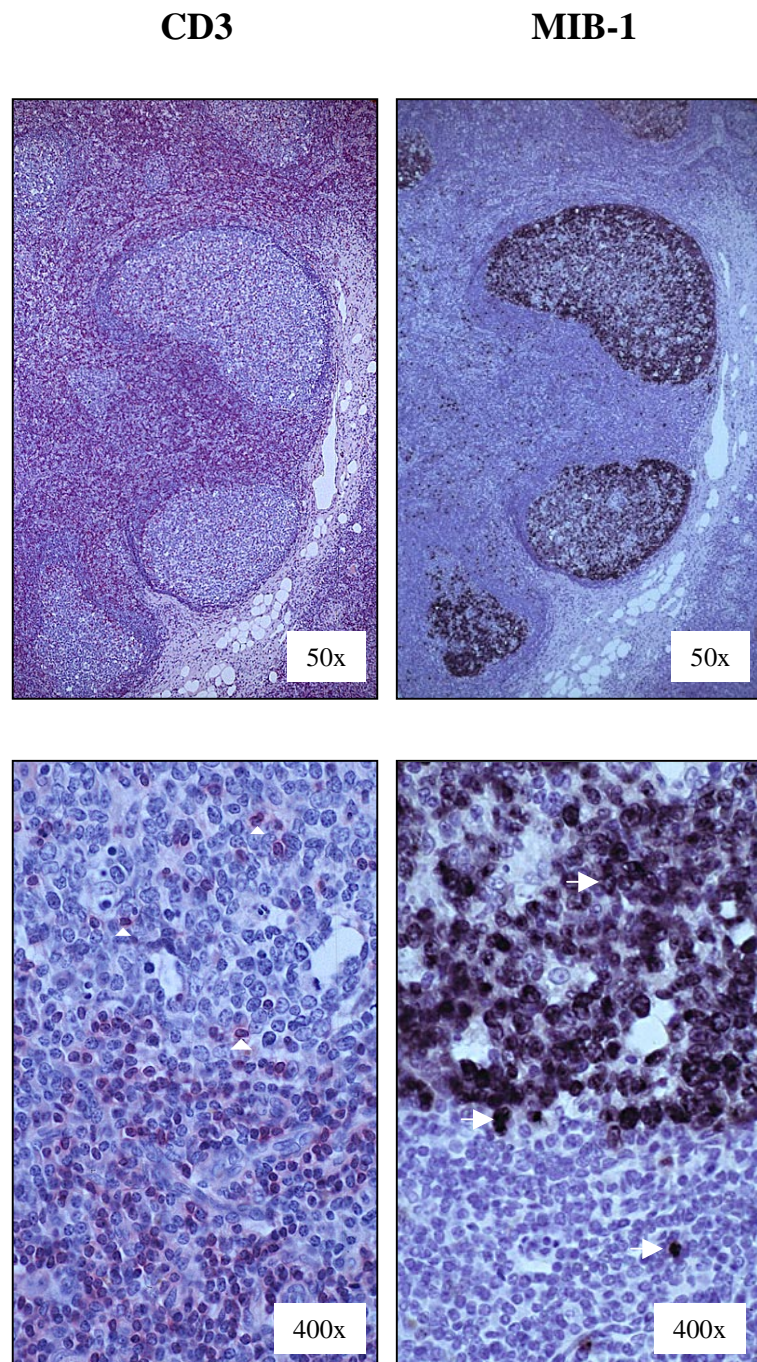


Abb. 4.3.2.3.1. Einfachfärbungen gegen CD3 und Ki-67 (MIB-1)

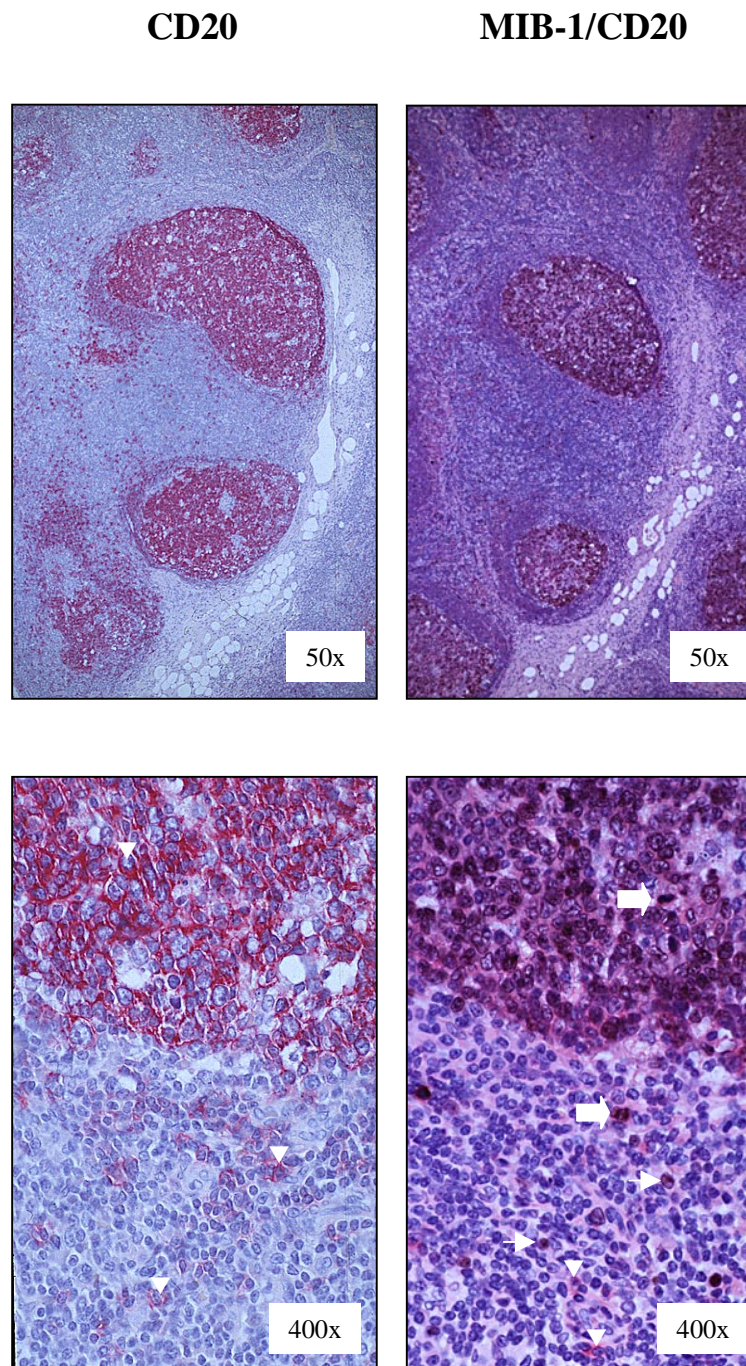


Abb. 4.3.2.3.2. Einfach- und Doppelfärbungen gegen CD20 und Ki-67 (MIB-1)

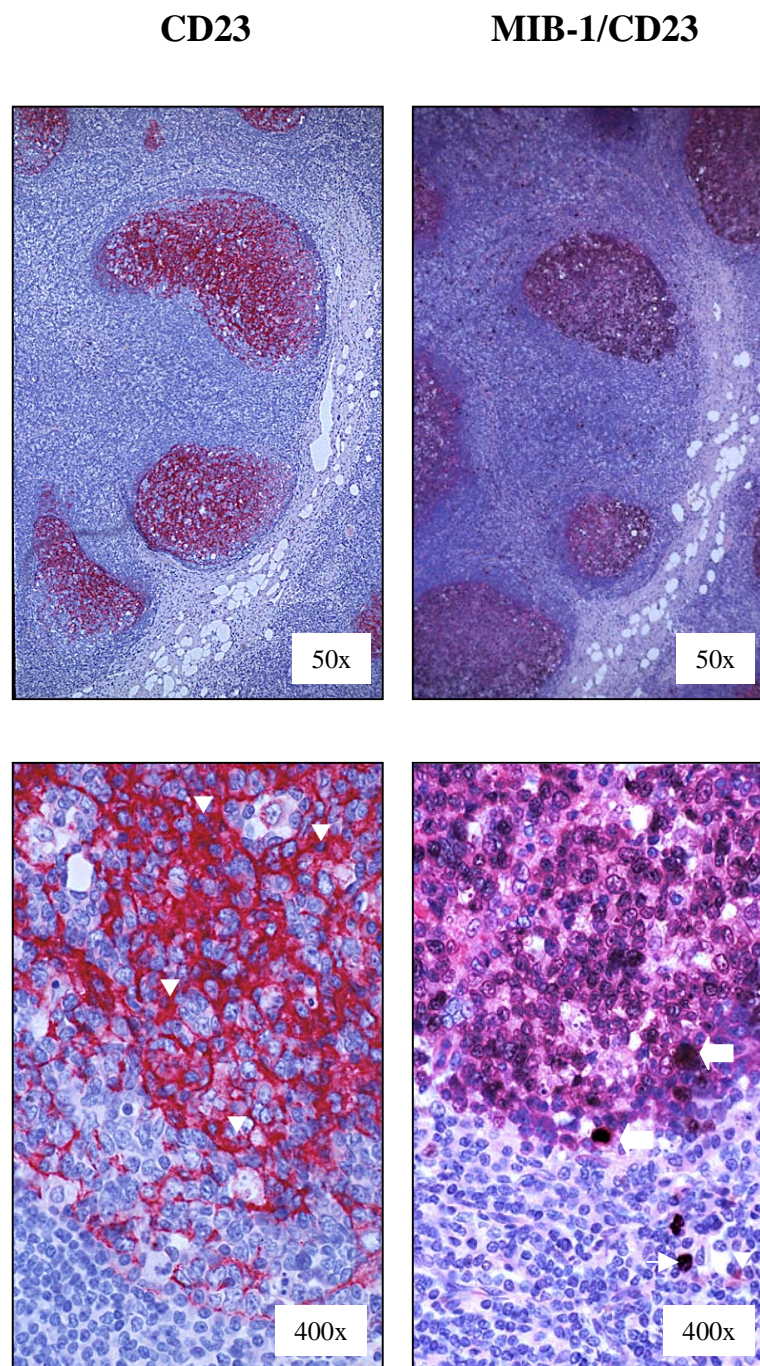


Abb. 4.3.2.3.3. Einfach- und Doppelfärbungen gegen CD23 und Ki67 (MIB-1)

4.4. Viruslast

4.4.1. Viruslast in Lymphknoten bei Patienten ohne IL-2 Therapie

Bei der HIV-Infektion spielen die Lymphknoten als Viruspool und als Ort der chronischen Virusausschwemmung in das periphere Blut eine wichtige Rolle. Deswegen werden im folgenden die Ergebnisse der Untersuchungen zur Viruslast im Lymphknoten präsentiert.

4.4.1.1. Korrelation der Viruslast in Lymphknoten zur Viruslast im Blut bei HIV-Patienten ohne IL-2 Therapie

Die beiden Kompartimente Blut und Lymphknoten wurden auf ihre Viruslast hin untersucht und verglichen.

Die Abbildung 4.4.1.1. zeigt die Korrelation der Viruslast im peripheren Blut zur Viruslast im Lymphknoten. Jeder Punkt im Schaubild entspricht einem

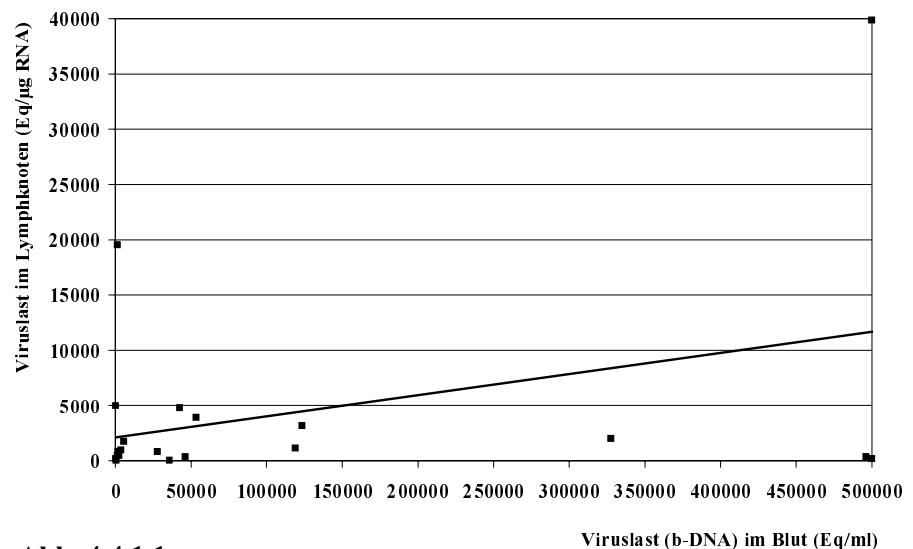


Abb. 4.4.1.1.

Patienten; die Viruslast im Blut, gemessen als b-DNA (Eq/ml) zum Zeitpunkt der Lymphknotenexstirpation, ist auf der x-Achse aufgetragen, die Viruslast im Lymphknoten (Eq/µg RNA) auf der y-Achse. Untersucht wurden Paraffinschnitte von 25 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART), aber kein Interleukin-2 erhielten.

Es zeigte sich eine Korrelation ($r=0,369$) der Viruslast im Lymphknoten zu der Viruslast im peripheren Blut. Bei einem großen Viruspool im Lymphknoten schien auch die Menge der ausgeschwemmten Viren anzusteigen.

Die Patientenbasisdaten und die Meßergebnisse finden sich in der Tabelle 4.1.3.1. auf den Seiten 60-61.

4.4.1.2. Korrelation der Viruslast in Lymphknoten zur CD4-Zellzahl im Blut bei HIV-Patienten ohne IL-2 Therapie

Wie schon in den vorherigen Kapiteln gezeigt werden konnte, besteht ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Viruslast im Blut und der Höhe der Apoptose im Blut (Kapitel 4.2.1.2.) und im Lymphknoten (Kapitel 4.2.3.5.). Ebenso ging eine hohe Viruslast im Lymphknoten mit einer hohen Apoptoserate einher (Kapitel 4.2.3.4.). Ein möglicher Mechanismus des fortschreitenden CD4-Zellverlustes bei HIV-positiven Patienten ist deren übermäßige Apoptose. Deshalb wurde die Viruslast im Lymphknoten, als Ort der Virusausschwemmung, untersucht und mit dem CD4-Zellstatus verglichen.

Die

Abbildung 4.4.1.2. zeigt die Korrelation der CD4-Zellen/μl im peripheren Blut zur Viruslast im Lymphknoten

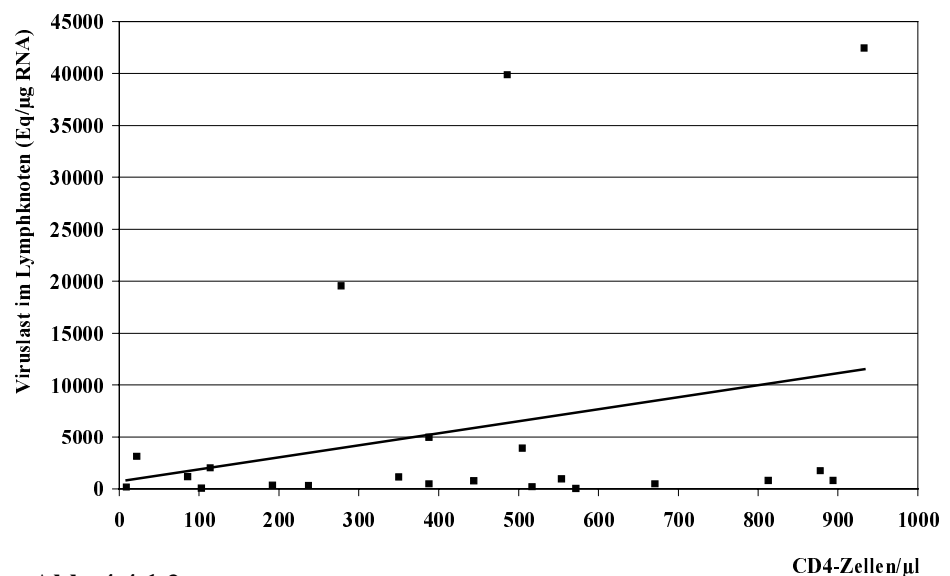


Abb. 4.4.1.2.

(Eq/μg RNA). Jeder Punkt im Schaubild entspricht einem Patienten; die CD4-Zellzahl zum Zeitpunkt der Lymphknotenexstirpation ist auf der x-Achse aufgetragen, die Viruslast im Lymphknoten auf der y-Achse. Untersucht wurden Paraffinschnitte von 25 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne Interleukin-2 erhielten.

Es zeigte sich eine Korrelation ($r=0,271$) der CD4-Zellzahl im peripheren Blut zu der Viruslast im Lymphknoten.

Die Patientenbasisdaten und die Meßergebnisse finden sich in der Tabelle 4.1.3.1. auf den Seiten 60-61.

4.4.1.3 Korrelation der Viruslast im Blut zu der CD4-Zellzahl im Blut bei HIV-Patienten ohne IL-2 Therapie

Neben der auf der vorangegangenen Seite gezeigten Korrelation der Viruslast im Lymphknoten mit den CD4-Zellen im Blut, wurde zum Vergleich die Viruslast im peripheren Blut mit dem Immunstatus korreliert.

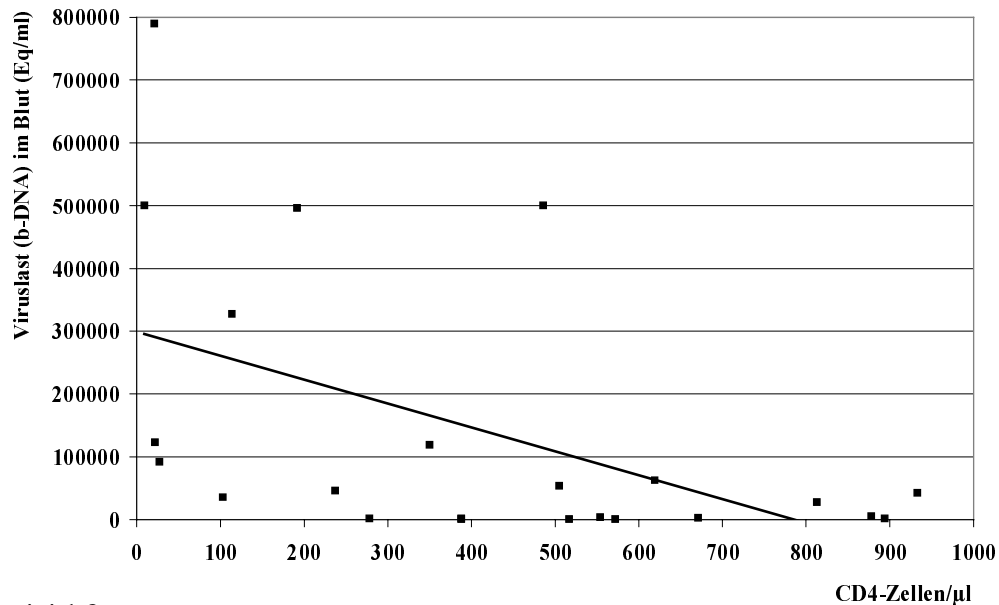


Abb. 4.4.1.3.

Die Abbildung 4.4.1.3. zeigt die Korrelation der CD4-Zellen/μl im peripheren Blut zur Viruslast (b-DNA, Eq/ml) im peripheren Blut. Jeder Punkt im Schaubild entspricht einem Patienten; die CD4-Zellzahl zum Zeitpunkt der Lymphknotenexstirpation ist auf der x-Achse aufgetragen, die Viruslast im peripheren Blut auf der y-Achse. Untersucht wurden Paraffinschnitte von 25 HIV-positiven Patienten, die eine antiretrovirale Therapie (ART) ohne Interleukin-2 erhielten.

Es zeigte sich eine deutliche inverse Korrelation ($r=-0,514$) der CD4-Zellzahl im peripheren Blut zu der Viruslast im peripheren Blut. Bei geringer Viruslastmenge im Blut fand sich ein relativ guter Immunstatus mit hohen CD4-Zellzahlen im Blut. Stieg die Menge der zirkulierenden Viren im Blut an, ging dies mit einem Abfall der CD4-Zellen im Blut einher.

Die Patientenbasisdaten und die Meßergebnisse finden sich in der Tabelle 4.1.3.1. auf den Seiten 60-61.

4.4.2. Viruslast in Lymphknoten bei HIV-Patienten unter IL-2 Therapie

Die Untersuchung der Viruslast in Lymphknoten vor und nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie wurde durchgeführt, weil das theoretische Risiko besteht, daß es durch den proliferationsfördernden Effekt unter IL-2 zu einer gesteigerten HI-Virusvermehrung kommt.

4.4.2.1. Viruslast in Lymphknoten vor und nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie

Die Abbildung 4.4.2.1. zeigt 5 HIV-positive Patienten, denen ein Lymphknoten vor und nach 6 Monaten unter IL-2-Therapie entnommen wurde. Auf der x-Achse sind die

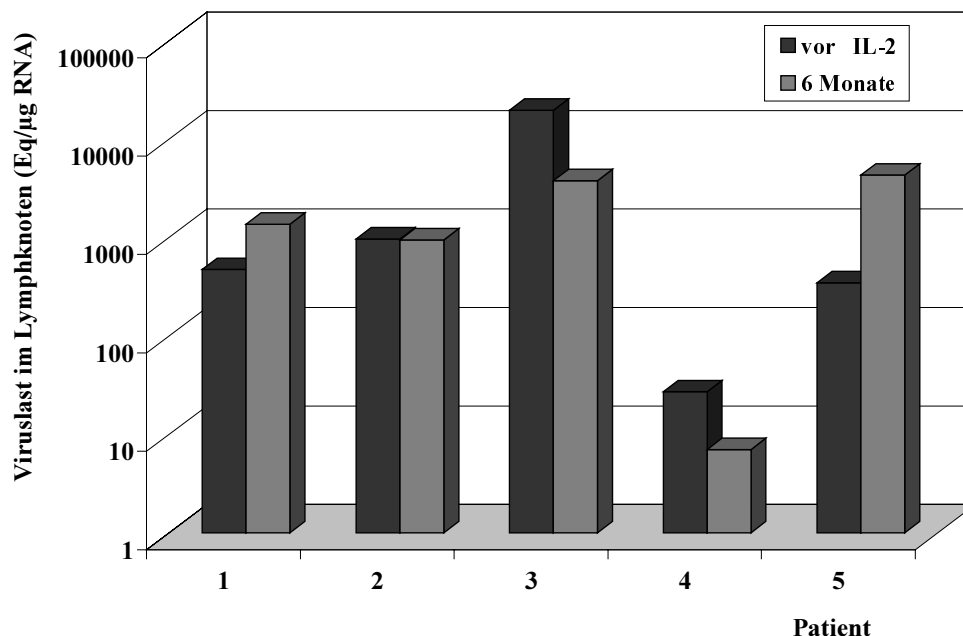


Abb. 4.4.2.1.

5 Patienten aufgetragen, jeweils vor und nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie. Auf der y-Achse ist die Höhe der Viruslast (Eq/μg RNA) aufgetragen. Es zeigte sich, daß die Viruslast im Lymphknoten unter einer IL-2 Therapie über 6 Monate im Mittel stabil blieb. Bei 2 Patienten zeigte sich unter IL-2 Therapie ein signifikanter Abfall und bei 1 Patienten ein signifikanter Anstieg der Viruslast.

Die Patientenbasisdaten und die Meßergebnisse finden sich in der Tabelle 4.1.4.3. auf der Seite 64.

Insgesamt zeigen diese Daten, daß IL-2 in Lymphknoten unter einer HAART keine signifikante Veränderung der Viruslast bewirkt, was für die Beurteilung der IL-2 Therapie und deren Sicherheit maßgeblich ist.

5. Diskussion

Im Rahmen einer Phase-II Studie der wiederholten, subkutanen Applikation von Interleukin (IL-2) zusammen mit hochaktiver antiretroviraler Therapie (HAART) bei HIV-positiven Patienten untersucht die vorliegende Arbeit den Einfluß einer solchen Therapie auf die Proliferation und Apoptose von Lymphozyten im peripheren Blut und in Lymphknoten von HIV-Patienten [51]. Parallel wurden Blut und Lymphknoten von HIV-positiven Patienten untersucht, die eine HAART, jedoch kein IL-2 erhielten.

5.1. Diskussion der Methode

Die Proliferation und Apoptose verschiedener Lymphozytensubpopulationen (CD4-, CD8- und CD56-Zellen) wurde im venösen Blut von 11 bzw. 13 IL-2 Patienten (jeweils vor IL-2 Zyklusbeginn am Tag 0, Tag 3, Tag 7 und Tag 14 nach Beginn) und 29 Kontrollpatienten ohne IL-2 Therapie untersucht. Ebenso wurden 5 Lymphknotenpaare (vor und 6 bzw. 24 Monate nach Therapiebeginn) auf Proliferation und Apoptose und 25 Kontrolllymphknoten von Patienten ohne IL-2 auf Apoptose untersucht. Alle drei Methoden mußten eingangs etabliert werden, was besonders bei den erst kürzlich verfügbaren Reagenzien zur Untersuchung der Apoptose schwierig war.

Die Proliferation der Lymphozyten wurde anhand des Proliferationsmarkers MIB-1 untersucht. Der apoptotische Zelltod wurde im Blut mittels des frühen Apoptosemarkers Annexin und in Lymphknoten mittels der TUNEL-Methode untersucht.

Die Untersuchung der Proliferation im Blut und in Lymphknoten wurde mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1 durchgeführt, welcher das nukleäre, zellproliferationsassoziierte, in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimierte Antigen Ki-67 nachweist [17, 61, 121].

Die Untersuchungen zur Apoptose im peripheren Blut wurden mit Hilfe des spezifischen Antikörpers Annexin durchgeführt, welcher an das externalisierte Membranprotein Phosphatidylserin der frühen apoptotischen Zelle binden kann [144]. Die Doppelfärbungen erfolgten mit den wichtigsten Lymphozytenmarkern für T-Helfer-, T-Suppressor- und NK-Zellen, welche auch in der Routine eingesetzt werden.

Die Messungen im peripheren Blut erfolgten standardmäßig mit einem Programm für doppeltmarkierte Zellen an dem 3-Color-Durchflußzytometer von Coulter.

An den Lymphknotenschnitten erfolgte die Doppelmarkierung der proliferierenden Ki-67 tragenden und CD4, CD8 und CD57 tragenden Lymphozyten mit Hilfe der sogenannten APAAP-Methode, welche zu den schon seit langem gut eingeführten Standardmethoden der Immunhistochemie zählt [25, 64, 101, 119]. Neben den genannten Subpopulationen der T-Zellen wurde auch die generelle Verteilung und Lokalisation der T- und B-Zellen im Lymphknoten (CD3, CD20, CD23) mit Hilfe der APAAP-Methode untersucht. Im ersten Durchlauf der APAAP-Methode wurden die proliferierenden Ki-67-positiven Zellen schwarz markiert. Daran wurden anschließend in der zweiten APAAP-Färbung die CD-Oberflächenantigene der Lymphozyten (CD4, CD8, CD57 bzw. CD3, CD20, CD23) rot gekennzeichnet. Die zwei Durchläufe waren notwendig, um Interferenzen zwischen den verschiedenen Antikörpern zu vermeiden und um eine unterschiedliche Anfärbung der Zellen zu erreichen (schwarze Kernfärbung der Ki-67-positiven Zellen, rote Membranfärbung der CD-tragenden Zellen). Der zweite Durchlauf der APAAP-Methode hatte keinen Einfluß auf die schon im ersten Schritt gebundenen Antikörper, wie durch entsprechende Kontrollen gezeigt werden konnte (Vergleich derselben Ausschnitte der mono- und doppeltgefärbten Lymphknotenschnitte auf die parallele Anfärbung derselben Zellen). Für die Markierung der apoptotischen Zellen in Lymphknoten wurde auf die TUNEL-Methode ausgewichen, da sich Annexin für immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten in zahlreichen Vorexperimenten als ungenügend erwiesen hatte. Die TUNEL-Methode basiert auf einer sensitiven und spezifischen Anfärbung freier 3'-OH Enden, wie sie in der Spätphase von apoptotischen Zellen auftreten [109, 122, 150]. Die Doppelmarkierung mit den CD4-, CD8- und CD57-Oberflächenantigenen der Lymphozyten erfolgte anschließend im zweiten Schritt wiederum mit der APAAP-Methode. Auch hier war der im ersten Schritt gebundene Antikörper stabil und wurde nicht negativ durch die nachfolgende APAAP-Methode beeinflusst.

Die Viruslast im Lymphknoten wurde nach RNA Extraktion mit Hilfe der Guanidin-Isothiocyanat Methode bestimmt [27, 45, 50, 116], die Maßeinheit entspricht HIV-Kopien/ μ g RNA.

5.2. Apoptose von Blutlymphozyten HIV-positiver Patienten

Bei den Patienten, die kein Interleukin-2 erhielten, zeigte sich im peripheren Blut eine Apoptoserate, die gut mit dem allgemeinen Immunstatus, erkennbar an der Zahl der T-Helferzellen und der Viruslast korrelierte. Man sah einen deutlichen Anstieg der Apoptoserate bei sich verschlechternder Immunqualität (Abb. 4.2.1.1.). Bei dem Vergleich zweier Patientenkollektive mit mehr bzw. weniger als 300 CD4-Zellen wiesen in dem Kollektiv mit weniger als 300 CD4-Zellen/µl 76,5% der Patienten mehr als 15% apoptotische Lymphozyten im Blut auf. Hingegen zeigte das Kollektiv mit relativ gutem Immunstatus (>300 CD4-Zellen) nur in 41,7% der Fälle mehr als 15% apoptotische Lymphozyten im Blut. Der größte Teil (58,3%) der Patienten wies weniger als 15% apoptotische Lymphozyten im Blut auf (Abb. 4.2.1.3.). Auch der Vergleich der klinischen Stadien (nach der CDC-Klassifikation der WHO) mit der Apoptoserate im peripheren Blut zeigte den Zusammenhang zwischen Immunstatus und Zelltod. In der gesunden Kontrollgruppe fand sich eine Apoptoserate von 6,3%. Bei den HIV-positiven Patienten fand man eine kontinuierliche Erhöhung der Apoptoserate im Blut von Stadium A bis zum Stadium C. Die Apoptoserate lag in den beiden klinischen Kategorien A (asymptomatisches Stadium) und B (symptomatische Patienten ohne AIDS) bei 8,8% bzw. bei 18,9%. In der klinischen Kategorie C (symptomatische Patienten mit AIDS) lag die Apoptoserate mit 24,6% apoptotischen Lymphozyten wesentlich höher (Abb. 4.2.1.4.).

Auch bei der Betrachtung der Viruslast im peripheren Blut (b-DNA) zeigte sich bei steigender Viruslast eine steigende Apoptoserate, d.h. Patienten mit einer hohen Viruslast im Blut hatten auch eine erhöhte Apoptoserate (Abb. 4.2.1.2.)

Diese Ergebnisse der Untersuchung peripherer Blutlymphozyten bei Patienten ohne IL-2 Therapie stehen im Einklang mit den Ergebnissen in der Literatur [43, 58, 59, 71, 81, 86, 93, 103, 117, 147]. Das eine steigende Apoptoserate während der HIV-Infektion für den Verlust der Immunzellen verantwortlich gemacht werden kann, wurde schon von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt [8, 43, 58, 86, 93, 103, 117]. Der programmierte Zelltod ist nicht nur auf die CD4-Zellen beschränkt, sondern findet sich auch in CD8-Zellen und in den B-Lymphozyten [43, 71, 117]. Auch finden sich erhöhte Apoptoseraten in Lymphknoten HIV-positiver Patienten [86]. Dabei sind nicht nur die HIV-infizierten Zellen von der Apoptose betroffen, sondern auch die

benachbarten, nicht infizierten Zellen [35]. Bei verschiedenen *in vitro* Untersuchungen peripherer Blutlymphozyten von HIV-positiven Patienten und gesunden Probanden mittels der durchflußzytometrischen Bestimmung der Propidium-Iodid-positiven [43, 103], TUNEL-positiven [58] und Fas (CD95-Rezeptor)-positiven Zellen [8, 59] zeigte sich eine deutliche Korrelation des programmierten Zelltodes mit dem Stadium der HIV-Infektion. Bei Patienten im Stadium AIDS zeigte sich die höchste Apoptoserate [43, 58, 59, 103]. Auch der Verlust der T-Zellen, insbesondere der CD4- und CD8-Zellen ging mit einer erhöhten Apoptoserate einher [43, 59, 103]. Ebenso ist die Expression des apoptoseabhängigen Fas (CD95)-Rezeptors und seines Liganden FasL auf CD4- und CD8-Zellen bei HIV-positiven Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden verstärkt und korreliert gut mit einer erhöhten Apoptoserate, mit dem Verlust an T-Zellen, dem fortschreitenden Immundefekt und der Viruslast [8, 98, 129]. Karmochkine et al. zeigten ebenfalls, daß eine erhöhte Apoptoserate peripherer Blutlymphozyten mit einer höheren Viruslast korreliert [58]. Diese hohen Viruslasten im peripheren Blut gehen einher mit einer deutlichen Herunterregulation des Apoptoseschutzproteins Bcl-2 in peripheren Blutlymphozyten [105, 120]. Bei der Untersuchung der Apoptose von Zellen HIV-positiver Patienten in fortgeschrittenen Stadien, gegenüber „long-term non-progressors“, (HIV-positive Patienten ohne Immundefekt über längere Zeit) und seronegativen Kontrollpatienten, zeigten Liegler et al. [74] ebenfalls einen deutlichen Zusammenhang von steigender Apoptoserate mit dem CD4-Zellverlust und steigender Viruslast. Hierbei war interessant, daß nicht nur die seronegativen Patienten eine deutlich niedrigere Apoptoserate zeigten, sondern ebenso die „long-term non-progressors“. Jedoch nicht alle Arbeitsgruppen konnten diese Ergebnisse bestätigen. Meyaard et al. fanden keine Korrelation der Apoptoserate zum fortschreitenden T-Zellverlust oder zum Stadium der HIV-Infektion [81]. Rothen et al. sahen keinen Zusammenhang von Apoptoserate und Viruslast im Blut [114].

5.3. Apoptose in Lymphknoten HIV-positiver Patienten

Die Untersuchung von Lymphknoten ist weit aufwendiger und für den Patienten belastender als eine Blutentnahme, so daß deutlich weniger Untersuchungen über apoptotische Vorgänge und Virusreplikation in Lymphknoten vorliegen als dies für die Werte im peripheren Blut der Fall ist. Dies trifft insbesondere für Längsschnittuntersuchungen zu. Dabei liegen ungefähr 98% der CD4-Lymphozyten

im Lymphgewebe vor und nur 2% im peripheren Blut [53, 148]. Auch finden zu Beginn der HIV-Infektion die initialen Replikationsvorgänge im Lymphknoten statt. Im Stadium der aktiven Replikation werden die Viren aus den Lymphknoten in das Blut abgegeben. Auch im Stadium der chronischen Infektion stellt der Lymphknoten neben anderen Körperkompartimenten, wie z.B. ZNS und dendritische Zellen, einen Pool latent infektiöser Zellen dar, aus dem beständig Viren ins Blut abgegeben werden [49, 95]. Weiterhin stellt die Mikroumgebung des Lymphgewebes den Ort der Antigenpräsentation und der Aktivierung immunkompetenter Zellen dar. Die Architektur und die Mikroumgebung der Lymphknoten wird durch die HIV-Infektion schwer in Mitleidenschaft gezogen [16, 89]. Während des Verlaufs der Erkrankung wird das komplexe follikulär-dendritische Zellnetzwerk der Keimzentren, welches den Ort der Antigenpräsentation und der Immunantwort der B-Zellen darstellt, zerstört [69, 89]. Dem zunehmenden Untergang der Lymphknotenstruktur folgt eine Zerstörung der Lymphozyten im Gewebe, z.B. durch apoptotische Vorgänge oder durch direkte Wirkung des Virus auf die Zelle. Die Funktion weiterer Zellen wie z.B. Gewebsmakrophagen und dendritischer Zellen wird in zunehmenden Maße beeinträchtigt [69, 96].

Muro-Cacho et al. [86] untersuchten Lymphknoten HIV-positiver Patienten und gesunder Probanden auf Apoptose und verglichen diese mit dem Stadium der HIV-Infektion und mit der Viruslast im Lymphknoten. Es zeigte sich eine drei- bis vierfach höhere Apoptoserate in den 19 Lymphknoten der HIV-positiven Patienten als bei den gesunden Probanden. Die Intensität der Apoptose korrelierte gut mit der allgemeinen Aktivität des Lymphgewebes, nicht aber mit dem Stadium der HIV-Infektion oder mit der Viruslast im Lymphknoten. Bei den von Bofill et al. [13] durchgeführten TUNEL-Färbungen von Lymphknotenschnitten von 22 HIV-positiven Patienten und Kontrollen fanden sich in den Kontrolllymphknoten nur wenige verstreute apoptotische Zellen, während die Anzahl der apoptotischen Zellen in den infizierten Lymphknoten deutlich höher war und vor allem in den Keimzentren und in den Mantelzonen zu sehen waren. Bei den apoptotischen Zellen handelte es sich hier vor allem um CD8-Zellen, von denen der größte Teil eine erniedrigte Expression des Apoptoseschutzproteins Bcl-2 aufwies [13].

Die Ergebnisse, die aus der Untersuchung des peripheren Blutes gewonnen wurden, spiegeln sich, im Gegensatz zu der Arbeit von Muro-Cacho [86], ebenfalls im

Lymphgewebekompartiment unserer 25 Patienten ohne IL-2 Therapie wider, denen ein Lymphknoten exstirpiert wurde. Auch hier korrelierte der allgemeine Immunstatus gut mit der Apoptoserate. Patienten mit hohen CD4-Zellzahlen im peripheren Blut wiesen auch eine geringere Rate an apoptotischen Zellen im Lymphknoten auf (Abb. 4.2.3.1.). Bei dem Vergleich zweier Patientenkollektive, mit weniger bzw. mehr als 500 CD4-Zellen, zeigte das Kollektiv mit weniger als 500 CD4-Zellen/ μ l in 66,7% der Fälle mehr als 25 apoptotische Lymphozyten pro Quadratmillimeter Lymphknotenfläche. Dahingegen beinhaltete das Kollektiv mit dem relativ guten Immunstatus (> 500 CD4-Zellen/ μ l) nur in 10% Patienten, die mehr als 25 apoptotische Lymphozyten/ mm^2 Lymphknotenfläche besaßen. Der größte Teil (90%) wies weniger als 25 apoptotische Zellen/ mm^2 Lymphknotenfläche auf (Abb. 4.2.3.2.).

Auch der Vergleich der klinischen Stadien (nach der CDC-Klassifikation der WHO [18]) mit der Apoptoserate in Lymphknoten zeigte den Zusammenhang zwischen Immunstatus und Zelltod. Wie bei den Ergebnissen im peripheren Blut, zeigte sich die höchste Apoptoserate im symptomatischen Stadium CDC/WHO C (AIDS) mit \bar{O} 32 apoptotischen Zellen/ mm^2 Lymphknotenfläche (Abb. 4.2.3.3.). Entsprechend niedriger lagen die Apoptoseraten im Stadium A (\bar{O} 20 apoptotische Zellen/ mm^2) und Stadium B (\bar{O} 21 apoptotische Zellen/ mm^2).

Auch bei der Untersuchung der Viruslast, die im Lymphknoten und im peripheren Blut bestimmt wurde, zeigte sich eine Korrelation der Apoptoserate im Lymphknoten mit der Viruslast im Lymphknoten und im Blut. Patienten mit hoher Viruslast zeigten hohe Apoptoseraten im Lymphknoten (Abb. 4.2.3.4. und 4.2.3.5.).

Unsere Untersuchungen zeigen in beiden Kompartimenten (Blut und Lymphknoten) vergleichbare Ergebnisse im Hinblick auf die Apoptoserate, Viruslast und Immunstatus. In beiden Kompartimenten korrelierte die steigende Apoptoserate mit der Verschlechterung des Stadiums der HIV-Infektion und mit dem Fortschreiten des Immundefektes, erkennbar an dem Abfall der CD4-Zellen im peripheren Blut. Auch die Viruslast im Lymphknoten korrelierte positiv mit der Apoptoserate im Lymphknoten, wobei wir im Gegensatz zur Arbeitsgruppe um Muro-Cacho nicht die provirale DNA mittels PCR-Amplifikation [86], sondern die virale HIV-RNA im Gewebe bestimmt haben. Dieses Ergebnis zeigte sich auch in der Arbeit von Finkel et al. [35], welche unter anderem Lymphknoten HIV-positiver Kinder auf Apoptose und

Anzahl der virusinfizierten Zellen untersuchten und eine deutliche Korrelation beider Parameter fanden. In unserer Untersuchung fand sich nur eine sehr leichte Korrelation der Viruslast im Blut (b-DNA-Technik) mit der Viruslast im Lymphknoten (HIV-Kopien/ μ g RNA). Dahingegen fand sich eine signifikante Korrelation der Viruslast im Serum und der Anzahl der virusinfizierten Zellen im Lymphknotengewebe bei der Untersuchung von Dianzani et al. [30]. Die in dieser Arbeit durchgeführte Art der Bestimmung der Virusmenge im Lymphgewebe anhand der Anzahl der infizierten Zellen scheint genauer zu sein als die bloße Messung der absoluten Virusmenge im Gewebe mittels HIV-DNA oder HIV-RNA, da diese Art der Messung unabhängig von der schwankenden Produktion von Viruspartikeln während der Replikationsvorgänge ist [30].

5.4. Proliferation und Apoptose in Blutlymphozyten und in Lymphknoten HIV-positiver Patienten unter IL-2 Therapie

Bei der Untersuchung des programmierten Zelltodes und der Proliferation von Lymphozyten unter IL-2 Therapie wurden 13 Patienten eingeschlossen, die am Beginn eines neuen IL-2 Zyklus (jeweils 3. oder 4. Zyklus) standen. Die Entnahme des Venenblutes zur durchflußzytometrischen Bestimmung wurde am Tag vor Beginn des Zyklus (Tag 0) und an den Tagen 3, 7 und 14 vorgenommen. Die subkutane Gabe des IL-2 erfolgte an den Tagen 1-5. Apoptose und Proliferation wurden parallel bei den gleichen Patienten untersucht. Bei der Untersuchung der Proliferation standen 2 Patienten weniger zu Verfügung.

Von 5 IL-2 Patienten standen inguinale oder axilläre Lymphknoten zur Verfügung, die einmal vor Beginn der IL-2 Studie, nach 6 Monaten und bei einem Patienten nochmals nach 24 Monaten unter IL-2 Therapie entnommen wurden. Diese wurden auf die Fragestellung in Hinsicht auf die Proliferation und Apoptose verschiedener Lymphozytensubpopulationen immunhistochemisch aufgearbeitet. Zusätzlich wurden die Lymphknoten auf ihre Viruslast, gemessen in HIV-spezifischer RNA/ μ g RNA, untersucht.

Als Hauptmechanismus der CD4-Zell-Homöostase bei der HIV-Infektion galt lange das labile Gleichgewicht von virusbedingter Zerstörung CD4-Rezeptoren tragender

Zellen und deren Neuproduktion als Versuch der Wiederherstellung des Immunsystems. Eine Reduzierung der Viruslast durch HAART sollte eine Rekonstituierung des Immunsystems durch Überwiegen der Proliferation bedingen [53, 148]. Nachfolgende Arbeiten zeigten aber, daß andere Mechanismen für die Wiederherstellung des CD4-Zellsystems unter antiretroviraler Therapie verantwortlich sein müssen [9, 24, 38, 42, 85, 88, 91, 106, 107, 108, 133, 134, 141, 152, 153]. Diskutierte Mechanismen waren die Mobilisation bzw. Umverteilung von Zellen, vor allem T-Gedächtniszellen und B-Zellen aus peripheren Geweben oder aus entzündeten Lymphknoten in das Blut und die erhöhte Überlebensrate der Lymphozyten im peripheren Blut nach Reduktion der Viruslast [19, 22, 36]. Dem frühen Anstieg der T-Gedächtniszellen im Blut nach HAART folgt ein weit langsamerer Anstieg der naiven T-Zellen über Monate [141]. Erklärbar wäre dieser späte Anstieg möglicherweise durch eine progressive Wiederherstellung des Thymus im Menschen [141]. Neben der Reduktion der Viruslast durch HAART könnte eine weitere Therapieoption in der echten Stimulation der Neuproduktion, z.B. durch Interleukin-2, als potenten Lymphzell-Stimulator, liegen.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich die proliferative Wirkung von IL-2 im peripheren Blut in einem drastischen Anstieg der MIB-1 positiven Lymphozyten um das 3,65-fache von 6,4% vor auf 23,4% eine Woche nach Gabe von IL-2, wobei die CD56-positiven natürlichen Killerzellen die schnellste Kinetik zeigten. Die Proliferationsrate stieg um das 2,15-fache bis zum dritten Tag unter IL-2 Gabe (vor Therapie 22,2%, Tag 3: 47,9%, Tag 7: 46,0%). Das Erreichen der maximalen Proliferation schon am dritten Tag unter IL-2 Gabe ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß natürliche Killerzellen bereits den mittelaaffinen IL-2 Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche tragen und so schneller auf das IL-2 reagieren können, als die CD4- und CD8-Zellen, welche den IL-2 Rezeptor erst noch exprimieren müssen, und so erst am siebten Tag ihr Maximum erreichen (Kapitel 2.3.2.). Das Ausmaß der Proliferation war jedoch mit dem Anstieg um das 4,2-fache bei den CD4-Zellen (vor Therapie: 9% bzw. nach Therapie: 39%) am stärksten ausgeprägt. Die CD8-Zellen zeigten einen Anstieg der Proliferation um das 3,8-fache nach einer Woche (Anstieg der proliferierenden Zellen von 8,5% auf 32,6%).

In absoluten Zahlen ausgedrückt zeigte sich dieser Proliferationseffekt des IL-2 in einem sechsfachen Anstieg der proliferierenden Gesamtlmphozyten um ca. 3 Milliarden Zellen (Tag 0: 640 Millionen, Tag 7: 3,7 Milliarden) bzw. in einem siebenfachen Anstieg der proliferierenden CD4-Zellen um ca. 1,1 Milliarden Zellen (Tag 0: 190 Millionen, Tag 7: 1,3 Milliarden). Die proliferierenden CD8-Zellen zeigten einen sechsfachen Anstieg um ca. 2,5 Milliarden Zellen (Tag 0: 474 Millionen, Tag 7: 3 Milliarden Zellen), die proliferierenden CD56-Zellen zeigten einen 4,5-fachen Anstieg um ca. 500 Millionen Zellen (Tag 0: 140 Millionen, Tag 7: 638 Millionen). Dieser Rechnung liegt ein Durchschnittswert der Lymphozytenzahl im Blut unserer Patienten von 2000 Gesamtlmphozyten/ μ l bzw. 400 CD4-Zellen/ μ l bzw. 1116 CD8-Zellen/ μ l bzw. 127 CD56-Zellen/ μ l vor Zyklusbeginn (Tag 0), sowie ein Durchschnittswert von 3200 Gesamtlmphozyten/ μ l bzw. 680 CD4-Zellen/ μ l bzw. 1841 CD8-Zellen/ μ l bzw. 277 CD56-Zellen/ μ l 7 Tage unter IL-2 zugrunde. Die Rechnung basiert auf einem Blutvolumen von 5 Litern.

Im peripheren Blut zeigte sich somit ein deutlicher proliferationsförender Effekt des IL-2 auf die getesteten Lymphozytensubpopulationen über 2 Wochen nach Beginn des neuen Zyklus. Unter einer ausschließlichen antiretroviralen Therapie konnte dieser direkte proliferative Effekt nicht nachgewiesen werden, sondern nur ein Anstieg der T-Zellen im Blut durch Umverteilung in den ersten Wochen nach Therapiebeginn [36, 141]. Eine zusätzliche Umverteilung von Zellen aus peripheren Geweben kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, es zeigt sich aber ein deutlicher Anstieg der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 auf den Zellen. Interessant wäre hierbei noch die Differenzierung der Lymphozyten in Gedächtnis-T-Zellen (z.B. CD45RO) und naive T-Zellen (CD45RA) gewesen, um zu erkennen, ob sich der IL-2-Effekt auch auf die naiven T-Zellen erstreckt, die unter HAART nur äußerst langsam ansteigen.

Die Wachstumsfraktionen der CD4-Zellen (MIB-1 positiv) korrelierten invers mit der relativen CD4-Zellzahl sowohl vor Beginn des neuen IL-2 Zyklus (Tag 0), als auch verstärkt am Tag 7 (2. Tag nach IL-2 Gabe). Dies zeigt, daß geringe CD4-Zellzahlen mit einer ansteigenden Proliferation (verstärkte Expression des Ki-67) der CD4-Lymphozyten einhergehen. Dieser Effekt kann auf die generelle Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen sein [88, 141], aber auch im Rahmen der CD4-Homöostase erklärt werden. Nach IL-2 Gabe (Tag 7) stieg die Anzahl proliferierender CD4-Zellen stark an. Vor allem die Patienten mit einem relativ niedrigen

prozentualen Anteil an CD4-Zellen zeigten unter IL-2 Gabe einen höheren Anteil an proliferierenden CD4-Zellen (Abb. 4.3.1.2.1.).

Es zeigte sich eine deutliche positive Korrelation zwischen der Wachstumsfraktion der CD4-Zellen (MIB-1 positiv) mit der Wachstumsfraktion der CD8-Zellen (Abb. 4.3.1.3.1.) sowohl am Tag 0 als auch am Tag 7. Dies zeigt, daß die Proliferation in den untersuchten Lymphozytenpopulationen vergleichbar ausgeprägt ist [115] und IL-2 omnivalent, d.h. nicht selektiv auf die untersuchten Lymphozytensubpopulationen wirkt.

In Lymphknoten fand sich nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie eine Verdreifachung des Anteils von natürlichen Killerzellen, während die CD8-Zellen nur mäßig um den Faktor 1.92, und die CD4-Zellen nicht signifikant um den Faktor 1.42 anstiegen. Die Anzahl der proliferierenden Gesamtzellzahl stieg um das 1,56-fache an (von 521,2 auf 814,8 MIB-1-positive Zellen/mm² Lymphknotenfläche). Auffällig war bei der Auszählung der verschiedenen Zellpopulationen im Lymphknoten, daß die Menge der proliferierenden Gesamtlymphozyten größer war als die Menge der proliferierenden T-Zellsubpopulationen zusammen (Abb. 4.3.2.1.5. auf der Seite 94). Die Differenz der Gesamtlymphozytenzahl zu den T-Zellsubpopulationen ist wahrscheinlich auf die große Anzahl von B-Zellen (CD20) und follikulär-dendritischen Zellen (CD23), die vor allem in den Keimzentren der Lymphknoten lokalisiert sind, zurückzuführen (siehe auch Abb. 4.3.2.3.2. und Abb. 4.3.2.3.3. auf den Seiten 102 und 103). Es wurde deshalb gezeigt, daß nicht nur die T-Zellen, sondern auch die B-Zellen durch IL-2 einen Wachstumsstimulus erhalten.

Diese Ergebnisse zeigen einen möglichen stimulierenden Langzeiteffekt des IL-2 auf Lymphorgane, den mit 98% aller Immunzellen größten Lymphzellpool des Körpers. Die Menge der proliferierenden Zellen nimmt deutlich zu, bei dem Patient SCJ zeigt sich auch nach 24 Monaten unter IL-2 Therapie ein nochmaliger Anstieg der MIB-1-positiven Zellen. Offenbar findet nicht nur im Blut, sondern auch in den Lymphknoten eine deutliche Neuproduktion von Lymphzellen als Antwort auf die IL-2-Gabe statt. Man muß allerdings bedenken, wie schon in früheren Untersuchungen [88, 137, 141] gezeigt, daß der Anstieg Ki-67 exprimierender Zellen auch auf eine generelle T-Zell-Aktivierung durch Virusreplikation und auf opportunistische Infektionen in späteren Stadien der HIV-Infektion zurückgeführt werden kann. Unter IL-2 Therapie in

Kombination mit HAART konnte allerdings die Viruslast in unserer Untersuchung gut kontrolliert werden und opportunistische Infektionen sind während der Meßperiode nicht aufgetreten. Die Rate dermatologischer Markererkrankungen [143], die den opportunistischen Infektionen vorausgehen und auf eine schwächer werdendes Immunsystem hindeuten (oropharyngeale Candida-Infektionen, orale Haarleukoplakie, Molluscum contagiosum, chronische Herpes-simplex Ulzera, Herpes-zoster Infektionen, Condylomata acuminata, Kaposi-Sarkome), sank ebenfalls ab [51].

Der Effekt einer subkutanen IL-2 Therapie bei HIV-positiven Patienten mit CD4-Zellzahlen zwischen 50/ μ l und 300/ μ l auf das Auftreten opportunistischer Infektionen (AIDS) und das Überleben ist zur Zeit Gegenstand der internationalen SILCAAT-Studie mit 1400 Patienten [126].

Bei der Untersuchung der Apoptoserate im peripheren Blut unter IL-2 zeigt sich eine transiente Erhöhung der lymphozytären Apoptose um das 1,3-fache von 19,7% auf 27% sieben Tage nach dessen Verabreichung, wobei alle getesteten Subpopulationen (CD4, CD8, CD56) betroffen waren. Den stärksten Anstieg der Apoptoserate vom ersten bis zum siebten Tag zeigten die CD4-Lymphozyten um das 1,46-fache (von 20,6% auf 30,2%) und die CD8-Lymphozyten um das 1,41-fache (von 22,9% auf 32,4%). Dahingegen stieg die Apoptoserate der CD56-Lymphozyten nur mäßig um das 1,1-fache bis zum siebten Tag nach IL-2 Gabe. Nach zwei Wochen hatte sich die Menge der apoptotischen Zellen fast wieder normalisiert, der Effekt der fünftägigen IL-2 Gabe auf die Induktion der Apoptose in den Lymphozyten schien vorübergehender Natur zu sein.

Wie schon von Fournel et al. [39] beschrieben, scheint IL-2 die Empfindlichkeit der Fas-Rezeptor vermittelten Apoptose zu verstärken, wobei der Grad der Fas-Rezeptor-Expression auf den Zellen nicht dem Einfluß von IL-2 unterliegt. Auch bei Versuchen mit Mäusen erhöhte sich die Empfindlichkeit der CD4- und CD8-Lymphozyten für den apoptotischen Zelltod nach IL-2 Gabe [70]. Eine alleinige hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) führte, parallel zur Reduktion der Viruslast und Anstieg der CD4-Zellen, zu einer verminderten Empfindlichkeit der Fas/Fas-Ligand vermittelten Apoptose in Lymphozyten [10]. Andererseits berichten Pandolfi et al. im Rahmen einer Studie mit 22 HIV-positiven asymptomatischen HIV-Patienten über eine Reduktion der lymphozytären Apoptoserate und einen parallelen Anstieg naiver

CD4-Zellen im peripheren Blut unter HAART in Kombination mit niedrig dosiertem IL-2 [92]. Die Apoptoserate der Gesamtlymphozytenzahl stieg im peripheren Blut zwar um den Faktor 1.3, die Proliferation war aber mit einem Anstieg um den Faktor 3.65 wesentlich deutlicher ausgeprägt. Der proliferationsfördernde Effekt von IL-2 überwog zahlenmäßig dessen vorübergehend beobachtete proapoptotische Wirkung. Hierdurch erklärt sich auch die Langlebigkeit des nach IL-2 Gabe beobachteten Anstiegs der Lymphozyten bis zu 24 Wochen [47, 51 und Hengge, persönliche Mitteilung].

Die Fraktion der apoptotischen CD4-Lymphozyten (Annexin-positiv) korrelierte invers mit der relativen CD4-Zellzahl, sowohl vor Beginn des neuen IL-2 Zyklus (Tag 0), als auch verstärkt am Tag 7 (2. Tag nach Ende der IL-2 Gabe). Dies zeigt, daß geringe CD4-Zellzahlen mit einer ansteigenden Apoptoserate (verstärkte Expression von Phosphatidylserin) der CD4-Lymphozyten einhergehen. Auch nach IL-2 Gabe (Tag 7) bleibt dieser Trend erkennbar. Vor allem die Patienten mit einem relativ niedrigen prozentualen Anteil an CD4-Zellen zeigten unter IL-2 Gabe einen höheren Anteil an apoptotischen CD4-Zellen (Abb. 4.2.2.2.1.). Die verstärkte Apoptoseneigung bei Patienten mit niedrigen CD4-Zellzahlen zeigt wieder den schon beschriebenen Zusammenhang zwischen einem schlechten Immunstatus und einer erhöhten Apoptoserate [86, 93, 103]. Der von verschiedenen Arbeitsgruppen [39, 70] beschriebene proapoptotische Effekt des IL-2 zeigte sich auch hier in einer unter IL-2 Gabe steigenden Apoptoserate.

Dahingegen zeigte die Fraktion der apoptotischen CD8-Lymphozyten (Annexin-positiv) keine Korrelation mit der relativen Zahl der CD8-Zellen am Tag 0. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein, daß die CD8-Zellzahlen trotz des sich verschlechternden Immunstatus relativ stabil bleiben [13]. Am Tag 7 ist jedoch eine umgekehrte Korrelation zu erkennen. IL-2 scheint eine deutlich höhere Apoptoserate der CD8-Lymphozyten bei Patienten mit niedrigen CD8-Zellzahlen zu bewirken (Abb. 4.2.2.2.2.), wahrscheinlich aufgrund der proapoptotischen Wirkung des IL-2 auf Lymphozyten.

Die Fraktion der apoptotischen CD56-Lymphozyten (Annexin-positiv) zeigte am Tag 0 eine umgekehrte Korrelation mit der relativen CD56-Zellzahl. Geringe absolute CD56-Zellzahlen gehen, wie schon bei den CD4-Zellen gezeigt, mit einer ansteigenden Apoptoserate (verstärkte Expression von Phosphatidylserin) der CD56-

Lymphozyten einher. Am Tag 7 zeigte sich kaum noch eine Korrelation. Die Apoptoserate der CD56-Zellen ist bei allen Patienten, sowohl bei niedrigen als auch bei hohen relativen CD56-Zellzahlen ähnlich (Abb. 4.2.2.2.3.).

In den fünf Lymphknoten vor und nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie fand sich ein deutlicher Anstieg der durchschnittlichen apoptotischen Gesamtzellzahl unter 6 Monaten IL-2 Therapie um das 2,3-fache des Ausgangswertes (von 37,8 auf 87,4 apoptotische Zellen/mm²). Den deutlichsten Anstieg zeigten die apoptotischen CD4-Zellen um das 3-fache des Ausgangswertes (von 1,9 auf 5,7 apoptotische Zellen/mm²) und die CD57-Zellen um das 2,5-fache (von 1,0 auf 2,5 apoptotische Zellen/mm²). Die CD8-Zellen stiegen um das 2,1-fache von durchschnittlich 4,1 auf 8,8 apoptotische Zellen/mm².

Die Lymphknoten von Patient SCJ zeigten nach 24 Monaten unter IL-2 eine Zunahme der apoptotischen CD4-Zellen, die Gesamtheit der apoptotischen Zellen, die CD8- sowie die CD57-Zellen fielen nach 24 Monaten wieder auf die Werte vor Beginn der IL-2 Therapie ab.

Die apoptotischen Zellen im Lymphknoten stiegen unter 6 Monaten IL-2 Therapie zwar um den Faktor 2,3 und die proliferierenden Zellen nur um den Faktor 1,56, trotzdem überwiegt die absolute Gesamtmenge der MIB-1-positiven Zellen aber mit 521,2/mm² vor bzw. 814,8/mm² nach IL-2 Therapie deutlich die Menge der apoptotischen, TUNEL-positiven Zellen (vor: 37,8, nach: 87,4 Zellen/mm²). Der proliferationsfördernde Effekt von IL-2 überwiegt auch in Lymphknoten zahlenmäßig dessen vorübergehend beobachtete proapoptotische Wirkung.

5.5. Viruslast in Lymphknoten HIV-positiver Patienten unter IL-2 Therapie

Die Untersuchung der Viruslast in Lymphknoten vor und nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie wurde durchgeführt, weil das theoretische Risiko besteht, daß es durch den proliferationsfördernden Effekt unter IL-2 zu einer gesteigerten Vermehrung von HIV kommt. In der oben zitierten IL-2 Studie wurde daher die Virusbelastung im peripheren Blut mittels b-DNA Technik untersucht [51]. Die Viruslast stieg in den vorliegenden Studien [21, 28] während der Behandlung mit IL-2 im allgemeinen nicht

meßbar an. Jedoch wird in der Literatur am Ende der IL-2 Infusionen im Plasma ein mittels des sehr empfindlichen branched-chain DNA Testes gemessener Anstieg der Viruskonzentrationen berichtet [65]. Erhöhungen der Viruskonzentration traten 1-3 Tage nach der Beendigung der IL-2 Infusionen auf und kehrten nach ca. 2 Wochen wieder auf den Ausgangswert zurück. Eine konstante Erhöhung des p24-Antigens oder der mittels b-DNA gemessene Viruslast von HIV-1 im Plasma fanden sich auch in der Literatur nicht. Lediglich bei einigen Patienten mit einer CD4-Zellzahl unter 100/ μ l zeigte sich eine andauernde Erhöhung dieser Parameter. In der Essener IL-2 Studie war die Viruslast im Blut unter der subkutanen Gabe von IL-2 stabil [51].

Die Viruslast der Lymphknoten wurde quantitativ mittels der b-DNA-Methode nach Extraktion der gesamten zellulären RNA bestimmt [27, 45, 50, 51]. Es zeigte sich in den untersuchten 5 Lymphknoten vor und nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie eine stabile Viruslast. Bei 2 Patienten sank die Viruslast ab, lediglich bei einem Patienten wurde 6 Monate unter IL-2 Therapie eine erhöhte Viruslast im Lymphknoten gemessen. Der Median lag vor Beginn der IL-2 Therapie bei 603 Kopien/ μ g RNA und unter 6 Monaten Therapie bei 631 Kopien/ μ g RNA. Zusammenfassend ist zu sagen, daß die virale Replikation unter der subkutanen Gabe von IL-2 und gleichzeitiger Gabe antiretroviraler Medikamente weder im Plasma noch in Lymphknoten signifikant anstieg.

6. Schlußfolgerungen

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen lassen sich für das Verständnis der HIV-Infektion und der begleitenden Behandlung mit Interleukin-2 folgende wesentliche Schlußfolgerungen ableiten:

Bei HIV-positiven Patienten, die mit HAART behandelt wurden und keine begleitende IL-2 Therapie erhielten, zeigte sich im Blut und Lymphknoten:

- eine stadienabhängige Steigerung der Apoptoserate bis zum Vollbild AIDS.
- eine positive Korrelation der apoptotischen Zellen mit dem zunehmenden Verlust an CD4-Zellen.
- eine Korrelation der Apoptose mit der Viruslast.

Bei HIV-positiven Patienten, die eine begleitende IL-2 Therapie und HAART erhielten, zeigte sich im Blut und Lymphknoten:

- eine deutliche Proliferation von CD4-positiven-, CD8-positiven- und CD56-positiven-Lymphozyten im peripheren Blut als Reaktion auf die subkutane IL-2-Gabe, ebenso ein deutlicher Anstieg proliferierender CD4-positiver-, CD8-positiver- und CD57-positiver Lymphozyten in Lymphknoten nach 6 Monaten unter IL-2-Gabe. Ein solcher Effekt konnte bisher unter HAART alleine nicht gezeigt werden.
- ein transienter Anstieg der Apoptoserate von CD4-positiven-, CD8-positiven- und CD56-positiven Lymphozyten im peripheren Blut und in den Lymphknoten nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie.
- insgesamt ein proliferationsfördernder Effekt des IL-2, der zahlenmäßig deutlich dessen vorübergehend beobachtete proapoptotische Wirkung überwog und nicht zelltypenspezifisch war.
- kein signifikanter Anstieg der viralen Replikation im Plasma oder Lymphknoten unter der subkutanen Gabe von IL-2 und gleichzeitiger Gabe antiretroviraler Medikamente.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen der wiederholten subkutanen Applikation von Interleukin-2 (IL-2) zusammen mit hochaktiver antiretroviraler Therapie (HAART) als Teil einer Phase-II Studie wurde der Einfluß einer solchen Therapie auf die Proliferation und Apoptose von Lymphozyten im peripheren Blut und in Lymphknoten von HIV-Patienten untersucht.

Die Proliferation und Apoptose verschiedener Lymphozytensubpopulationen (Helfer-, Suppressor-, Killerzellen) wurde durchflußzytometrisch in venösem Blut von 11 bzw. 13 IL-2 Patienten und 29 Kontrollpatienten ohne IL-2 Therapie sowie lichtmikroskopisch in 5 Lymphknotenpaaren (vor bzw. 6 (24) Monate nach Therapiebeginn) und in 25 Kontrolllymphknoten von Patienten ohne IL-2 Therapie untersucht. Die Proliferation der Lymphozyten wurde anhand des Proliferationsmarkers „MIB-1“ untersucht. Der apoptotische Zelltod wurde im Blut mittels des frühen Apoptosemarkers „Annexin“ und in Lymphknoten mittels einer immunhistochemischen Färbemethode („TUNEL-Methode“) analysiert.

Die Anzahl der apoptotischen Zellen im Blut und in Lymphknoten korrelierte mit der T-Helferzellzahl, der Viruslast und dem Stadium der HIV-Erkrankung. IL-2 führte eine Woche nach Verabreichung zu einer transienten Erhöhung der lymphozytären Apoptoserate von 19% auf 27%, wobei alle getesteten Subpopulationen betroffen waren.

Die proliferative Wirkung von IL-2 zeigte sich im peripheren Blut in einem drastischen Anstieg der MIB-1-positiven Lymphozyten von 6% vor auf 23% eine Woche nach Gabe von IL-2, wobei die natürlichen Killerzellen (den mittelhochaffinen IL-2 Rezeptor tragend) die schnellste Kinetik zeigten. Das Ausmaß der Proliferation war jedoch bei den T-Helferzellen (vor Therapie: 9% bzw. nach Therapie: 39%) am stärksten ausgeprägt.

In relativen Zahlen ausgedrückt zeigte sich der Proliferationseffekt des IL-2 in einem sechsfachen Anstieg der proliferierenden Gesamtlmphozyten um ca. 3 Milliarden Zellen bzw. in einem siebenfachen Anstieg der proliferierenden T-Helferzellen um ca. 1,1 Milliarden Zellen. Die proliferierenden Suppressorzellen zeigten einen sechsfachen Anstieg um ca. 2,5 Milliarden Zellen, während die proliferierenden natürlichen Killerzellen einen 4,5-fachen Anstieg um ca. 500 Millionen Zellen zeigten.

In den Lymphknoten fand sich eine Verdreifachung des Anteils natürlicher Killerzellen, während die T-Helferzellen um den Faktor 1.43 nicht signifikant anstiegen.

Der Anstieg verschiedener Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und in Lymphknoten von HIV-Patienten demonstriert erstmals die Proliferation von Lymphozyten, die bislang durch HAART alleine nicht gezeigt werden konnte [51, 141]. Die Proliferation der Gesamtlmphozytenzahl stieg im peripheren Blut signifikant um den Faktor 3.65, wohingegen die Apoptoserate nur um den Faktor 1.3 anstieg. Ebenso zeigte sich im Lymphknoten ein deutlicher Netto-Proliferationseffekt. Die Proliferation stieg nach 6 Monaten unter IL-2 Therapie zwar relativ nur um den Faktor 1.56, wohingegen die apoptotischen Zellen im Lymphknoten um den Faktor 2.3 anstiegen. Die absolute Gesamtmenge der proliferierenden Zellen überwog aber mit 521,2/mm² vor bzw. 814,8/mm² unter 6 Monaten IL-2 Therapie deutlich die Menge der apoptotischen Zellen (vor: 37,8 bzw. nach: 87,4 Zellen/mm²). Der proliferationsfördernde Effekt von IL-2 überwog zahlenmäßig dessen vorübergehend beobachtete proapoptotische Wirkung. Eine zusätzliche Umverteilung von Lymphozyten aus den Lymphknoten in das periphere Blut kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Dermatologische Markererkrankungen [143], die auf ein schwächer werdendes Immunsystem hindeuten waren 3-6 mal häufiger in der Kontrollgruppe, als in den mit IL-2 behandelten Patientengruppen [51]. Der Effekt einer subkutanen IL-2 Therapie bei HIV-positiven Patienten mit T-Helferzellzahlen zwischen 50/µl und 300/µl auf opportunistische Infektionen ist zur Zeit unter anderem Gegenstand der Untersuchung der internationalen SILCAAT-Studie an 1400 Patienten [126]. Diese Experimente unterstreichen den Wert einer kombinierten IL-2- und hochaktiven antiretroviralen Therapie zur partiellen Immunrekonstitution bei der HIV-Infektion. Ähnliche Ergebnisse können von Melanompatienten erwartet werden, die adjuvant u.a. mit IL-2 behandelt werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Aandahl, E.M., Aukrust, P., Müller, F., Hansson, V., Taskén, K., Frøland, S.S. (1999):
Additive effects of IL-2 and protein kinase type I antagonist on function of T-cell from HIV-infected patients on HAART.
AIDS 13, F109-F114.
2. Adachi, Y., Oyaizu, N., Than, S., McCloskey, T.W., Pahwa, S. (1996):
IL-2 rescues in vitro lymphocyte apoptosis in patients with HIV infection. Correlation with its ability to block culture-induced down-modulation of bcl-2.
J. Immunol. 157, 4184-4193.
3. Adams, J.M., Cory, S. (1998):
The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.
Science 281, 1322-1326.
4. Akbar, A.N., Borthwick, N., Salmon, M., Gombert, W., Bofill, M., Shamsadeen, N., Pilling, D., Pett, S., Grundy, J.E., Janossy, G. (1993):
The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T-cells in normal individuals and patients with acute viral infection. The role of apoptosis in T-cell memory.
J. Exp. Med. 178, 427-438.
5. Ameisen, J.C., Capron, A. (1991):
Cell dysfunction and depletion in AIDS: The programmed cell death hypothesis.
Immunol. Today 12, 102-105.
6. Ameisen, J.C., Estaquir, J., Idziorek, T., DeBels, F. (1995):
The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis.
Trends Cell Biol. 5, 27-31.
7. Andersson, J., Behbahani, H., Lieberman, J., Connick, E., Landay, A., Patterson, B., Sonnerborg, A., Lore, K., Uccini, S., Fehninger, T.E. (1999):
Perforin is not co-expressed with granzyme A within cytotoxic granules in CD8 T lymphocytes present in lymphoid tissue during chronic HIV infection.
AIDS 13, 1295-1303.
8. Aries, S.P., Schaaf, B., Müller, C., Dennin, R.H., Dalhoff, K. (1995):
Fas (CD95) expression on CD4+ T cells from HIV-infected patients increases with disease progression.
J. Mol. Med. 73, 591-593.
9. Autran, B., Carcelain, G., Li, T.S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debré, P., Leibowitch, J. (1997):
Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease.
Science 277, 112-116.

10. Badley, A.D., Dockrell, D.H., Algeciras, A., Ziesmer, S., Landay, A., Lederman, M.M., Connick, E., Kessler, H., Kuritzkes, D., Lynch, D.H., Roche, P., Yagita, H., Paya, C.V. (1998):
In vivo analysis of Fas/FasL interactions in HIV infected patients.
J. Clin. Invest. 102, 79-87.
11. Badley, A.D., McElhinny, J.A., Leibson, P.J., Lynch, D.H., Alderson, M.R., Paya, C.V. (1996):
Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T-lymphocytes.
J. Virol. 70, 199-206.
12. Bellamy, C.O.C. (1996):
P53 and apoptosis.
Br. Med. Bull. 53, 522-538.
13. Bofill, M., Gombert, W., Borthwick, N.J., Akbar, A.N., McLaughlin, J.E., Lee, C.A., Johnson, M.A., Pinching, A.J., Janossy, G. (1995):
Presence of CD3+CD8+Bcl-2 low lymphocytes undergoing apoptosis and activated macrophages in lymph nodes of HIV-1+ patients.
Am. J. Pathol. 146, 1542-1555.
14. Brown, R. (1996):
The bcl-2 family of proteins.
Br. Med. Bull. 53, 466-477.
15. Bucy, R.P., Hockett, R.D., Derdeyn, C.A., Saag, M.S., Squires, K., Sillers, M., Mitsuyasu, R.T., Kilby, J.M. (1999):
Initial increase in blood CD4+lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues.
J. Clin. Invest. 103, 1391-1398.
16. Camacho, S.A., Kosco-Vilbois, M.H., Berek, C. (1998):
The dynamic structure of the germinal center.
Immunol. Today 19, 511-513.
17. Cattoretti, G., Becker, M.H.G., Key, G., Duchrow, M., Schlüter, C., Galle, J., Gerdes, J. (1992):
Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.
J. Pathol. 168, 357-367.
18. Centers For Disease Control (1993):
1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults.
MMWR 41 (RR-17), 1-19.

19. Chen, J.J.Y., Cloyd, M.W. (1999):
The potential importance of HIV-induction of lymphocyte homing to lymph nodes.
Int. Immunol. 11, 1591-1594.
20. Chun, T.W., Engel, D., Mizell, S.B., Hallahan, C.W., Fischette, M., Park, S., Davey, R.T., Dybul, M., Kovacs, J.A., Metcalf, J.A., Mican, J.M., Berrey, M.M., Corey, L., Lane, H.C., Fauci, A.S. (1999):
Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4⁺ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy.
Nat. Med. 5, 651-655.
21. Clark, A.G.B., Holodiny, M., Schwartz, D.H., Katzenstein, A., Merigan, T.C. (1992):
Decrease in HIV provirus in peripheral blood mononuclear cells during zidovudine and human rIL-2 administration.
J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 5, 52-59.
22. Cloyd, M.W., Chen, J.J., Wang, I. (2000):
How does HIV cause AIDS? The homing theory.
Mol. Med. Today 6, 108-111.
23. Cloyd, M.W., Lynn, W.S. (1991):
Perturbation of host-cell membrane is a primary mechanism of HIV cytopathicity.
Virology 181, 307-309.
24. Connors, M., Kovacs, J.A., Krevat, S., Gea-Banacloche, J.C., Sneller, M.C., Flanagan, M., Metcalf, J.A., Walker, R.E., Falloon, J., Baseler, M., Feuerstein, I., Masur, H., Lane, H.C. (1997):
HIV infection induces changes in CD4⁺ T-cell phenotype and depletions within the CD4⁺ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies.
Nat. Med. 3, 533-540.
25. Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N., Ghosh, A.K., Abdulaziz, Z., McDonald, S., Pulford, K., Stein, H., Mason, D.Y. (1984):
Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP-complexes).
J. Histochem. Cytochem. 32, 219-229.
26. Cordiali-Fei, P., Solmone, M., Viora, M., Vanacore, P., Pugliese, O., Giglio, A., Caprilli, F., Ameglio, F. (1994):
Apoptosis in HIV infection: Protective role of IL-2.
J. Biol. Regul. Homeost. Agent 8, 60-64.

27. Dailey, P., Wilber, J., Urdea, M. (1994):
HIV load in lymphoid tissues using branched DNA (bDNA) signal amplification.
Tenth International Conference on AIDS/International Conference on STD.
Yokohama, August, 1994 Tokyo: Japanese Foundation for AIDS Prevention,
1994: 2. (abstract PA0200).
28. Davey, R.T., Chaitt, D.G., Piscitelli, S.C., Wells, M.J., Kovacs, J.A., Walker,
R.A., Falloon, J., Polis, M.A., Metcalf, J.A., Masur, H., Fyfe, G., Lane, H.C.
(1997):
Subcutaneous administration of interleukin-2 in human immunodeficiency virus
type-1 infected persons.
J. Infect. Dis. 175, 781-789.
29. Desbarats, J., Freed, J.H., Campbell, P.A., Newell, M.K. (1996):
Fas (CD95) expression and death-mediating function are induced by CD4 cross-
linking on CD4⁺ T-cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11014-11018.
30. Dianzani, F., Antonelli, G., Riva, E., Uccini, S., Visco, G. (1996):
Plasma HIV viremia and viral load in lymph nodes.
Nat. Med. 8, 832-833.
31. Dimitrov, D.S. (1997):
How do viruses enter cells? The HIV coreceptors teach us a lesson of complexity.
Cell 91, 721-730.
32. Estaquier, J., Tanaka, M., Suda, T., Nagata, S., Goldstein, P., Ameisen J.C. (1996):
Fas mediated apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from human
immunodeficiency virus infected persons: differential in vitro preventive effect of
cytokines and protease antagonists.
Blood 87, 4959-4966.
33. Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Land, H., Brooks, M., Littlewood, T.,
Waters, C., Hancock, D. (1992):
Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein.
Cell 69, 119-128.
34. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson,
P.M. (1992):
Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers
specific recognition and removal by macrophages.
J. Immunol. 148, 2207-2216.
35. Finkel, T.H., Tudor-Williams, G., Banda, N.K., Cotton, M.F., Curiel, T., Monks,
C., Baba, T.W., Ruprecht, R.M., Kupfer, A. (1995):
Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively
infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes.
Nat. Med. 1, 129-134.

36. Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., Gallant, J., Markowitz, M., Ho, D.D., Richman, D.D., Siliciano, R.F. (1997):
Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy.
Science 278, 1295-1300.

37. Flad, H.D., Ernst, M., Kern, P. (1986):
A phase I/II trial of recombinant IL-2 in AIDS/ARC: alterations of phenotypes of peripheral blood mononuclear cells.
Lymphokine Res. 5, 171-176.

38. Fleury, S., de Boer, R.J., Rizzardi, G.P., Wolthers, K.C., Otto, S.A., Welbon, C.C., Graziosi, C., Knabenhans, C., Soudeyns, H., Bart, P.A., Gallant, S., Corpataux, J.M., Gillet, M., Meylan, P., Schnyder, P., Meuwly, J.Y., Spreen, W., Glauser, M.P., Miedema, F., Pantaleo, G. (1998):
Limited CD4⁺ T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy.
Nat. Med. 4, 794-801.

39. Fournel, S., Genestier, L., Robinet, E., Flacher, M., Revillard, J.P. (1996):
Human T cells require IL-2 but not G1/S Transition to acquire susceptibility to Fas-mediated apoptosis.
J. Immunol. 157, 4309-4315.

40. Glücksmann, A. (1951):
Cell deaths in normal vertebrate development.
Biol. Rev. 26, 59-86.

41. Goldstein, P., Ojcius, D.M., Young, D.E. (1991):
Cell death mechanisms and the immune system.
Immunol. Rev. 121, 29-65.

42. Gorochov, G., Neumann, A.U., Kereveur, A., Parizot, C., Li, T., Katlama, C., Karmochkine, M., Raguin, G., Autran, B., Debré, P. (1998):
Perturbation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4⁺ repertoire during antiretroviral therapy.
Nat. Med. 4, 215-221.

43. Gougeon, M.L., Lecoœur, H., Dulioust, A., Enouf, M.G., Crouvoisier, M., Goujard, C., Debord, T., Montagnier, L. (1996):
Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV infected persons. Increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression.
J. Immunol. 156, 3509-3520.

44. Gulick, R.M., Mellors, J.W., Havlir, D., Eron, J.J., Gonzalez, C., McMahon, D., Richman, D.D., Valentine, F.T., Jonas, L., Meibom, A., Emini, E.A., Chodakewitz, J.A. (1997):
Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy.
N. Engl. J. Med. 337, 734-739.

45. Harris, M., Patenaude, P., Cooperberg, P., Filipenko, D., Thorne, A., Raboud, J., Rae, S., Dailey, P., Chernoff, D., Todd, J., Conway, B., Montaner, J.S. (1997):
Correlation of virus load in plasma and lymph node tissue in human immunodeficiency virus infection.
J. Infect. Dis. 176, 1388-1392.

46. Hashimoto, F., Oyaizu, N., Kalyanaraman, V.S., Pahwa, S. (1997):
Modulation of bcl-2 protein by CD4 cross-linking: a possible mechanism for lymphocyte apoptosis in human immunodeficiency virus infection and for rescue of apoptosis by interleukin-2.
Blood 90, 745-753.

47. Hellerstein, M., Hanley, M.B., Cesar, D., Siler, S., Papageorgopoulos, C., Wieder, E., Schmidt, D., Hoh, R., Neese, R., Macallan, D., Deeks, S., McCune, J.M. (1999):
Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans.
Nat. Med. 5, 83-89.

48. Hengartner, M.O., Horvitz, H.R. (1994):
The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 345, 243-248.

49. Hengge, U.R., Brockmeyer, N.H., Esser, S., Maschke, M., Goos, M. (1998):
HIV-1 RNA levels in cerebrospinal fluid and plasma correlate with AIDS dementia.
AIDS 12, 818-820.

50. Hengge, U.R., Chan, E.F., Foster, R.A., Walker, P.S., Vogel, J.C. (1995):
Cytokine gene expression in epidermis with biological effect following injection of naked DNA.
Nat. Genet. 10, 161-166.

51. Hengge, U.R., Goos, M., Esser, S., Exner, V., Dötterer, H., Wiehler, H., Borchard, C., Müller, K., Beckmann, A., Eppner, M.T., Berger, A., Fiedler, M. (1998):
Randomised, controlled trial of subcutaneous interleukin-2 in combination with highly active antiretroviral therapy in HIV patients.
AIDS 12, 225-234.

52. Hertogs, K., de Bethune, M.P., Miller, V., Ivens, T., Schel, P., van Cauwenberge, A., van den Eynde, C., van Gerwen, V., Azijin, H., van Houtte, M., Peters, F., Staszewski, S., Conant, M., Bloor, S., Kemp, S., Larder, B., Pauwels, R. (1998):
A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type-1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs.
Antimicrob. Agents Chemother. 42, 269-276.

53. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M. (1995):
Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.
Nature 373, 123-126.

54. Horwitz, J.P., Chua, J., Noel, M., Donatti, J.T., Freisler, J. (1966):
Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. II. Some dihalo-3-indolyl phosphates and sulfates.
J. Med. Chem. 9, 447.

55. Hosaka, N., Oyaizu, N., Kaplan, M.H., Yagita, H., Pahwa, S. (1998):
Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons.
J. Infect. Dis. 178, 1030-1039.

56. Investigator's brochure (1992):
Information for investigators: Proleukin, recombinant IL-2 (human).
Cetus Oncology Division: Chiron Corporation.

57. Jacobson, E.L., Pilato, F., Smith, K.A. (1996):
Rational interleukin-2 therapy for HIV-positive individuals: Daily low doses enhance immune function without toxicity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10405-10410.

58. Karmochkine, M., Parizot, C., Calvez, V., Coutellier, A., Herson, S., Debré, P., Gorochoy, G. (1998):
Susceptibility of peripheral blood mononuclear cells to apoptosis is correlated to plasma HIV load.
J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 17, 419-423.

59. Katsikis, P.D., Wunderlich, E.S., Smith, C.A., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A. (1995):
Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T-lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals.
J. Exp. Med. 181, 2029-2036.

60. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972):
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br. J. Cancer 26, 239-257.

61. Key, G., Becker, M.H.G., Baron, B., Duchrow, M., Schluter, C., Flad, H.D., Gerdes, J. (1993):
New Ki-67 equivalent murine monoclonal antibodies (MIB1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 c-DNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope.
Lab. Invest. 68, 629-636.

62. Kinter, A., Fauci, A.S. (1996):
Interleukin-2 and human immunodeficiency virus infection: pathogenetic mechanisms and potential for immunologic enhancement.
Immunol. Res. 15, 1-15.

63. Koga, Y., Nakamura, K., Sasaki, M., Kimura, G., Nomoto, K. (1992):
The difference in gp160 and gp120 of HIV type 1 in the induction of CD4 downregulation preceding single cell killing.
Virology 201, 137-141.

64. Kolles, H., Förderer, W., Bock, R., Feiden, W. (1993):
Combined Ki-67 and Feulgen stain for morphometric determination of the Ki-67 labelling index.
Histochemistry 100, 293-296.

65. Kovacs, J.A., Baseler, M., Dewar, R.J., Vogel, S., Davey, R.T., Falloon, J., Polis, M.A., Walker, R.E., Stevens, R., Salzman, N.P., Metcalf, J.A., Masur, H., Lane, H.C. (1995):
Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection. A preliminary study.
N. Engl. J. Med. 332, 567-575.

66. Kovacs, J.A., Vogel, S., Albert, J.M., Falloon, J., Davey, R.T., Walker, R.E., Polis, M.A., Spooner, K., Metcalf, J.A., Baseler, M., Fyfe, G., Lane, H.C. (1996):
Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus.
N. Engl. J. Med. 335, 1350-1356.

67. Kutza, J., Hayes, M.P., Clouse, K.A. (1998):
Interleukin-2 inhibits HIV-1 replication in human macrophages by modulating expression of CD4 and CC-chemokine receptor-5.
AIDS 12, 59-64.

68. Lane, H.C., Siegel, J.P., Rook, A.H., Masur, H., Gelman, E.P., Quinnan, G.V., Fauci, A.S. (1984):
Use of interleukin-2 in patients with acquired immunodeficiency syndrome.
J. Biol. Response Mod. 3, 512-516.

69. Legendre, C., Raphael, M., Gras, G., Lefevre, E.A., Feuillard, J., Dormont, D., Richard, Y. (1998):
CD80 expression is decreased in hyperplastic lymph nodes of HIV+ patients.
Int. Immunol. 10, 1847-1851.

70. Lenardo, M.J. (1991):
Interleukin-2 programs mouse $\alpha\beta$ T lymphocytes for apoptosis.
Nature 353, 858-861.
71. Lewis, D.E., Tang, D.S., Adu-Oppong, A., Schober, W., Rodgers, J.R. (1994):
Anergy and apoptosis in CD8+ T cells from HIV-infected persons.
J. Immunol. 153, 412-420.
72. Levy Y., Capitant, C., Houhou, S., Carriere, I., Viard, J.P., Goujard, C., Gastaut, J.A., Oksenhendler, E., Boumsell, L., Gomard, E., Rabian, C., Weiss, L., Guillet, J.G., Delfraissy, J.F., Aboulker, J.P., Seligmann, M. (1999):
Comparison of subcutaneous and intravenous interleukin-2 in asymptomatic HIV-1 infection: a randomised controlled trial. ANRS 048 study group.
Lancet 353, 1923-1929.
73. Li, C.J., Friedmann, D.J., Wang, C., Meteleev, V., Pardee, A.B. (1995):
Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein.
Science 268, 429-431.
74. Liegler, T.J., Yonemoto, W., Elbeik, T., Vittinghoff, E., Buchbinder, S.P., Greene, W.C. (1998):
Diminished spontaneous apoptosis in lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected long-term nonprogressors.
J. Infect. Dis. 178, 669-679.
75. Lin, S.J., Roberts, R.L., Ank, B.J., Nguyen, Q.H., Thomas, E.K., Stiehm, E.R. (1997):
Human immunodeficiency virus (HIV) type-1 gp120-specific cell-mediated cytotoxicity (CMC) and natural-killer (NK) activity in HIV-infected (HIV+) subjects: enhancement with interleukin-2 (IL-2), IL-12, and IL-15.
Clin. Immunol. Immunopathol. 82, 163-173.
76. Lockshin, R.A., Beaulaton, J. (1974):
Programmed cell death.
Life. Sci. 15, 1549-1965.
77. Lotze, M.T., Matory, Y.L., Rayner, A.A., Ettinghausen, S.E., Vetto, J.T., Seipp, C.A., Rosenberg, S.A. (1986):
Clinical effects and toxicity of interleukin-2 in patients with cancer.
Cancer 58, 2764-2772.
78. Lynch, D.H., Ramsdell, F., Alderson, M.R. (1995):
Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses.
Immunol. Today 16, 569-574.

79. Martinon, F., Michelet, C., Peguillet, I., Taoufik, Y., Lefebvre, P., Goujard, C., Guillet, J.G., Delfraissy, J.F., Lantz, O. (1999):
Persistent alterations in T-cell repertoire, cytokine and chemokine receptor gene expression after 1 year of highly active antiretroviral therapy.
AIDS 13, 185-194.
80. McMahon, D.K., Armstrong, J.A., Huang, X.L., Rinaldo, C.R., Gupta, P., Whiteside, T.L., Pazin, G.J., Tripoli, C., Ho, M. (1994):
A phase I study of subcutaneous recombinant interleukin-2 in patients with advanced HIV disease while on zidovudine.
AIDS 8, 59-66.
81. Meyaard, L., Otto, S.A., Keet, I.P.M., Roos, M.T.L., Miedema, F. (1994):
Programmed death of T cells in human immunodeficiency virus infection. No correlation with progression to disease.
J. Clin. Invest. 93, 982-988.
82. Miyawaki, T., Uehara, T., Nibu, R., Tsuji, T., Yachie, A., Shin, Y., Taniguchi, N. (1992):
Differential expression of apoptosis related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood.
J. Immunol. 149, 3753-3758.
83. Miyawaki, T., Liu, Z.J., Kawahara, A., Minami, Y., Yamada, K., Tsujimoto, Y., Barsoumian, E.L., Perimutter, R.M., Taniguchi, T. (1995):
Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in haematopoietic cell proliferation.
Cell 81, 223-231.
84. Moore, J.P. (1997):
Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy.
Science 276, 51-52.
85. Mosier, D.E. (1995):
HIV results in the frame. CD4⁺ cell turnover.
Nature 375, 193-194.
86. Muro-Cacho, C.A., Pantaleo, G., Fauci, A.S. (1995):
Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with the stage of disease or viral burden.
J. Immunol. 154, 5555-5566.
87. Nagata, S., Goldstein, P. (1995):
The Fas death factor.
Science 267, 1449-1455.

88. Orendi, J.M., Bloem, A.C., Borleffs, J.C.C., Wijnholds, F.J., de Vos, N.M., Nottet, H.S.L.M., Visser, M.R., Snippe, H., Verhoef, J., Boucher, C.A.B. (1998): Activation and cell cycle antigens in CD4+ and CD8+ T cells correlate with plasma human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA Level in HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* 178, 1279-1287.
89. Orenstein, J.M., Feinberg, M., Yoder, C., Schrager, L., Mican, J.M., Schwartzentruber, D.J., Davey, R.T., Walker, R.E., Falloon, J., Kovacs, J.A., Miller, K.D., Fox, C., Metcalf, J.A., Masur, H., Polis, M.A. (1999): Lymph node architecture preceding and following 6 month of potent antiviral therapy: follicular hyperplasia persists in parallel with p24 antigen restoration after involution and CD4 cell depletion in an AIDS patient. *AIDS* 13, 2219-2229.
90. Oyaizu, N., Pahwa, S. (1995): Role of apoptosis in HIV disease pathogenesis. *J. Clin. Immunol.* 15, 217-231.
91. Pakker, N.G., Notermans, D.W., de Boer, R.J., Roos, M.T., de Wolf, F., Hill, A., Leonard, J.M., Danner, S.A., Miedema, F., Schellekens, P.T. (1998): Biphasic kinetics of peripheral blood T-cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat. Med.* 4, 208-214.
92. Pandolfi, F., Pierdominici, M., Marziali, M., Livia Bernardi, M., Antonelli, G., Galati, V., D'Offizi, G., Aiuti, F. (2000): Low dose IL-2 reduces lymphocyte apoptosis and increases naive CD4 cells in HIV-1 patients treated with HAART. *Clin. Immunol.* 94, 153-159.
93. Pandolfi, F., Pierdominici, M., Oliva, A., Offizi, D., Mezzaroma, I., Mollicone, B., Giovanetti, A., Rainaldi, L., Quinti, I., Aiuti, F. (1995): Apoptosis related mortality in vitro of mononuclear cells from patients with HIV infection correlates with disease severity and progression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 9, 450-458.
94. Pantaleo, G., Fauci, A.S. (1995): Apoptosis in HIV infection. *Nat. Med.* 1, 118-120.
95. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C.H., Orenstein, J.M., Kotler, D.P., Fauci, A.S. (1993): HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362, 355-358.

96. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F., Cohen, O.J., Vaccarezza, M., Ganttt, K., Muro-Cacho, C., Fauci, A.S. (1994):
Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection.
Immunol. Rev. 140, 105-129.
97. Park, I.W., Kondo, E., Bergeron, L., Park, J., Sodroski, J. (1996):
Effects of human immunodeficiency virus type 1 infection on programmed cell death in the presence or absence of bcl-2.
J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 12, 321-328.
98. Patki, A.H., Georges, D.L., Ledermann, M.M. (1997):
CD4+-T-cell counts, spontaneous apoptosis, and Fas expression in peripheral blood mononuclear cells obtained from human immunodeficiency virus type 1 infected subjects.
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4, 736-741.
99. Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., Ho, D.D. (1996):
HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time.
Science 271, 1582-1586.
100. Peter, M.E., Ehret, A., Berndt, C., Krammer, P.H. (1997):
AIDS and the death receptors.
Br. Med. Bull. 52, 604-616.
101. Poletti, A., Giacon, C., Pennelli, N. (1992):
Simultaneous visualization of immunodetected antigens and tissue components revealed by non enzymatic histochemical stains.
J. Histochem. Cytochem. 40, 1965-1970.
102. Powell, F.C., Spooner, K.M., Shawker, T.H., Premkumar, A., Thakore, K.N., Vogel, S.E., Kovacs, J.A., Masur, H., Feuerstein, I.M. (1994):
Symptomatic interleukin-2-induced cholecystopathy in patients with HIV infection.
AJR Am. J. Roentgenol. 163, 117-121.
103. Prati, E., Gorla, R., Malacarne, F., Airo, P., Brugnani, D., Gargiulo, F., Tebaldi, A., Castelli, F., Carosi, G., Cattaneo, R. (1997):
Study of spontaneous apoptosis in HIV patients: correlation with clinical progression and T cell loss.
AIDS Res. Hum. Retroviruses 13, 1501-1508.
104. Prins, J.M., Jurriaans, S., van Praag, R.M.E., Blaak, H., van Rij, R., Schellekens, P.T.A., ten Berge, I.J.M., Yong, S.L., Fox, C.H., Roos, M.T.L., de Wolf, F., Goudsmit, J., Schuitemaker, H., Lange, J.M.A. (1999):
Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy.
AIDS 13, 2405-2410.

105. Re, M., Gibellini, D., Aschbacher, R., Vignoli, M., Furlini, G., Ramazotti, E., Bertolaso, L., La Placa, M. (1998):
High levels of HIV-1 replication show a clear correlation with downmodulation of bcl-2 protein in peripheral blood lymphocytes of HIV-1 seropositive subjects.
J. Med. Virol. 56, 66-73.
106. Roederer, M., de Rosa, S.C., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A. (1998):
Immunology of T cells in AIDS: Dynamics revealed by eight-color flow cytometry.
In: Kresina, T. (Ed.): Immune Modulating Agents, S. 209-220.
New York: Marcel Dekker.
107. Roederer, M., Dubs, J.G., Anderson, M.T., Raju, P.A., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A. (1995):
CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults.
J. Clin. Invest. 95, 2061-2066.
108. Roederer, M., Raju, P.A., Mitra, D.K., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A. (1997):
HIV does not replicate in naive CD4 T cells stimulated with CD3/CD28.
J. Clin. Invest. 99, 1555-1564.
109. Rösl, F. (1992):
A rapid and simple method for detection of apoptosis in human cells.
Nucleic Acids Res. 20, 5243.
110. Rook, A.H., Masur, H., Lane, H.C., Frederick, W., Kasahara, T., Macher, A.M., Djeu, J.Y., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Fauci, A.S., Quinnan, G.V. (1983):
Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immune deficiency syndrome.
J. Clin. Invest. 72, 398-403.
111. Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Chang, A.E., Avis, F.P., Leitmann, S., Linehan, W.M., Robertson, C.N., Lee, R.E., Rubin, J.T. (1987):
A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone.
N. Engl. J. Med. 316, 889-897.
112. Rosenberg, Y.J., Shafferman, A., White, B.D., Papermaster, S.F., Leon, E., Eddy, G.A., Benviste, R., Burke, D.S., Lewis, M.G. (1992):
Variation in the CD4⁺ and CD8⁺ populations in lymph nodes does not reflect that in the blood during SIVMNE/E11S infection of macaques.
J. Med. Primatol. 21, 131-137.
113. Roth, M.D. (1994):
Interleukin-2 induces the expression of CD45RA⁺ peripheral blood lymphocytes.
J. Exp. Med. 179, 857-864.

114. Rothen, M., Gratzl, S., Hirsch, H.H., Moroni, C. (1997):
Apoptosis in HIV-infected individuals is an early marker occurring independly of high viremia.
AIDS Res. Hum. Retroviruses 13, 771-779.
115. Sachsenberg, N., Perelson, A.S., Yerly, S., Schockmel, G.A., Leduc, D., Hirschel, B., Perrin, L. (1998):
Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen.
J. Exp. Med. 187, 1295-1303.
116. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989):
Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2. Ed.
New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press; S. 7.19-7.22.
117. Samuelsson, A., Brostrom, C., van Dijk, N., Sonnerborg, A., Chiodi, F. (1997):
Apoptosis of CD4+ and CD19+ cells during human immunodeficiency virus type 1 infection-correlation with clinical progression, viral load and loss of humoral immunity.
Virology 238, 180-188.
118. Saunders, J.W., Fallon, J.S. (1966):
Cell death in morphogenesis.
In: Lock, M. (Ed.):
Major problems in developmental biology.
25th Symposium of the Society for Developmental Biology. S.289-314.
New York: Academic Press.
119. Schaumburg-Lever, G. (1987):
The alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase technique in dermatopathology.
J. Cutan. Pathol. 14, 6-9.
120. Scheuring, U.J., Sabzevari, H., Corbeil, J., Theofilopoulos, A.N. (1999):
Differential expression profiles of apoptosis-affecting genes in HIV-infected cell lines and patient T-cells.
AIDS 13, 167-175.
121. Schlüter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M.H.G., Key, G., Flad, H.D., Gerdes, J. (1993):
The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle maintaining protein.
J. Cell Biol. 123, 513-522.
122. Schmitz, G., Walter, T., Seibl, R., Kessler, C. (1991):
Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase.
Anal. Biochem. 192, 222-231.

123. Schwartz, D.H., Skowron, G., Merigan, T.C. (1991):
Safety and effects of interleukin-2 plus zidovudine in asymptomatic individuals infected with human immunodeficiency virus.
J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 4, 11-23.
124. Semenzato, G., Zambello, R., Pizzolo, G. (1992):
Interleukin-2 receptor expression in health and disease.
In: Waxmann, F., Balkwill, F. (Eds.):
Interleukin-2.
S. 78-105. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
125. Siegel, J.P., Puri, R.K. (1991):
Interleukin-2 toxicity.
J. Clin. Oncol. 9, 694-704.
126. A phase III multicenter randomized study of the biological and clinical efficacy of subcutaneous recombinant human interleukin-2 in HIV-infected patients with low CD4+ counts under active antiretroviral therapy (SILCAAT).
Protocol CS-L2-9901.
127. Silvestris, F., Cafforio, P., Frassanito, M.A., Tucci, M., Romito, A., Nagata, S., Dammacco, F. (1996):
Overexpression of Fas antigen on T-cells in advanced HIV-1 infection: Differential ligation constantly induces apoptosis.
AIDS 10, 131-141.
128. Sloand, E.M., Maciejewski, J.P., Sato, T., Bruny, J., Kumar, P., Kim, S., Weichold, F.F., Young, N.S. (1998):
The role of interleukin-converting enzyme in Fas mediated apoptosis in HIV-1 infection.
J. Clin. Invest. 101, 195-201.
129. Sloand, E.M., Young, N.S., Kumar, P., Weichold, F.F., Sato, T., Maciejewski, J.K. (1997):
Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication.
Blood 89, 1357-1363.
130. Smith, K.A. (1988):
Interleukin-2: inception, impact and implications.
Science 240, 1169-1176.
131. Sodroski, J., Goth, W.C., Rosen, C.A., Campbell, K., Haseltine, W. (1986):
Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity.
Nature 322, 470-474.

132. Somasundaran, M., Robinson, H.L. (1987):
A major mechanism of human immunodeficiency virus induced cell killing does not involve cell fusion.
Nature 322, 470-474.
133. Spina, C.A., Prince, H.E., Richman, D.D. (1997):
Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro.
J. Clin. Invest. 99, 1774-1785.
134. Sprent, J., Tough, D. (1995):
HIV results in the frame. CD4+ cell turnover.
Nature 375, 194.
135. Steller, H. (1995):
Mechanisms and genes of cellular suicide.
Science 267, 1445-1449.
136. Stevenson, M., Meier, C., Mann, A.M., Chapman, N., Wasiak, W. (1988):
Envelope glycoprotein of HIV induces interference and cytolysis resistance in CD4+ cells: mechanism for persistence in AIDS.
Cell 53, 483-496.
137. Tenner-Racz, K., Stellbrink, H.J., van Lunzen, J., Schneider, C., Jacobs, J.P., Raschdorff, B., Großschupff, G., Steinmann, R.M., Racz, P. (1998):
The unenlarged lymph nodes of HIV-1 infected, asymptomatic patients with high CD4 T cell counts are sites for virus replication and CD4 T cell proliferation. The impact of highly active antiretroviral therapy.
J. Exp. Med. 187, 949-959.
138. Teppler, H., Kaplan, G., Smith, K., Cameron, P., Montana, A., Meyn, P., Cohn, Z. (1993):
Efficacy of low doses of the polyethylene glycol derivative of interleukin-2 in modulating the immune response of patients with human immunodeficiency virus type-1 infection.
J. Infect. Dis. 167, 291-298.
139. Thèze, J., Alzari, P.M., Bertoglio, J. (1996):
Interleukin-2 and its receptors: recent advances and new immunological functions.
Immunol. Today 17, 481-486.
140. Thompson, C.B. (1995):
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science 267, 1456-1462.

141. Tissot, O., Viard, J.P., Rabian, C., Ngo, N., Burgard, M., Rouzioux, C., Penit, C. (1998):
No evidence for proliferation in the blood CD4⁺ cell pool during HIV-1 infection and triple combination therapy.
AIDS 12, 879-884.
142. Trump, B.F., Goldblatt, P.J., Stowell, R.E. (1965):
Studies of mouse liver necrosis in vitro: ultrastructural and cytochemical alterations in hepatic parenchymal cell nuclei.
Lab. Invest. 14, 1969-1999.
143. Tschachler, E., Bergstresser, P.R., Stingl, G. (1996):
HIV-related skin diseases.
Lancet 348, 659-663.
144. Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C.P.M. (1995):
A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V.
J. Immunol. Methods 180, 39-52.
145. Volberding, P., Moody, D.J., Beardslee, D., Bradley, E.C., Wofsy, C.B. (1987):
Therapy of acquired immune deficiency syndrome with recombinant interleukin-2.
AIDS Res. Hum. Retroviruses 3, 115-124.
146. Warren, J.L. (1992):
The interleukin-2 receptor: structure, function, intracellular messengers and molecular regulation.
In: Waxmann, F., Balkwill, F. (Eds.): Interleukin-2.
S. 29-46. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
147. Wasmuth, J.C., Klein, K.H., Hackbarth, F., Rockstroh, J.K., Sauerbruch, T., Spengler, U. (2000):
Prediction of imminent complications in HIV-1-infected patients by markers of lymphocyte apoptosis.
J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 23, 44-51.
148. Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H. (1995):
Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.
Nature 373, 117-122.
149. Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M., Krammer, P.H. (1995):
Sensitization of T-cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120.
Nature 375, 497-500.

150. Wijsman, J.H., Jonker, R.R., Keijzer, R., van de Velde, C.J., Cornelisse, C.J., van Dierendonck, J.H. (1993):
A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA.
J. Histochem. Cytochem. 41, 7-12.
151. Williams, N. (1998):
Can IL-2 smoke out HIV reservoirs?
Science 282, 1394-1395.
152. Wolthers, K.C., Wisman, G.B.A., Siegrid, A.O., de Roda Husman, A.M., Schaft, N., de Wolf, F., Goudsmit, J., Coutinho, R.A., van der Zee, A.G.J., Meyaard, L., Miedema, F. (1996):
T cell telomere length in HIV-1 infection: no evidence for increased CD4+ T cell turnover.
Science 274, 1543-1547.
153. Woods, T.C., Roberts, B.D., Butera, S.T., Folks, T.M. (1997):
Loss of inducible virus in CD45RA naive cells after human immunodeficiency virus-1 entry accounts for preferential viral replication in CD45RO memory cells.
Blood 89, 1635-1641.
154. Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. (1984):
Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis.
J. Pathol. 142, 67-77.
155. Wyllie, A.H. (1997):
Apoptosis: an overview.
Br. Med. Bul. 53, 451-465.
156. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1993):
The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme.
Cell 75, 641-652.
157. Zerhouni, B., Sanhadji, K., Kehrli, L., Livrozet, J.M., Thouraine, J.L. (1997):
Interleukin (IL)-2 deficiency aggravates the defect of natural killer cell activity in AIDS-patients.
Thymus 24, 147-156.
158. Zou, W., Foussat, A., Houhou, S., Durand-Gasselin, I., Dulioust, A., Bouchet, L., Galanaud, P., Levy, Y., Emilie, D. (1999):
Acute upregulation of CCR-5 expression by CD4+ T lymphocytes in HIV-infected patients treated with interleukin-2.
AIDS 13, 455-463.

9. Anhang

9.1. Lebenslauf

Carsten Borchard

30.01.1972	geboren in Münster, Nordrhein-Westfalen
1978-1982	Grundschule in Münster
1982-1991	Gymnasium Kinderhaus in Münster
06.06.1991	Allgemeine Hochschulreife
8/91-10/92	Zivildienst als Lagerungspfleger im Zentral-OP/Klinikum Münster
10/92-06/99	Studium der Humanmedizin
10/92-03/95	Vorklinischer Studienabschnitt an der Universität Bochum
03/95	Ärztliche Vorprüfung
03/95-06/99	Klinischer Studienabschnitt an der Universität GH Essen
03/96	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/96-02/99	Wissenschaftlicher Hilfsmitarbeiter am Uniklinikum Essen/Dermatologie im Rahmen der Interleukin-2 Studie bei HIV-positiven Patienten
03/98	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
06/98-03/99	Praktisches Jahr am Uniklinikum Essen, Schwerpunkt Dermatologie
05/99	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/99	AiP in den Katholischen Kliniken Essen Nord, Innere Abteilung
02/01	Assistenzarzt in den Katholischen Kliniken Essen Nord, Innere Abteilung/Gastroenterologie

9.2. Danksagung

Herrn PD Dr. U.R. Hengge danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Unterstützung während der Erstellung der Arbeit.

Frau D. Schiffer gilt mein Dank für die Bestimmung der Viruslast in den Lymphknoten und die Überlassung der Daten.

Frau Funk, Frau M.T. Eppner und Frau A. Beckmann danke ich herzlich für die Hilfe am Durchflußzytometer.

Frau Löckenhoff danke ich für das Schneiden der Paraffinblöcke, Frau M. Schröder gilt mein großer Dank für die Einarbeitung und Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen der Paraffinschnitte.

Dem Fotografen H. Apel gebührt mein Dank für den großen Einsatz bei der Erstellung und Bearbeitung des Bildmaterials.

